

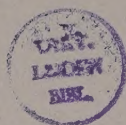
**EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
STANDARDISIERUNG VON BAKTERIELLEN
PRÄPARATEN ZUR STIMULIERUNG DER
PARASPEZIFISCHEN ABWEHR**

LOTHAR WIELER

1987

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026



Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

**EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
STANDARDISIERUNG VON BAKTERIELLEN
PRÄPARATEN ZUR STIMULIERUNG DER
PARASPEZIFISCHEN ABWEHR**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tiermedizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Lothar Wieler
aus
Königswinter

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. Dr.h.c.mult. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. M.J. Forstner

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. THEORETISCHER HINTERGRUND	2
2.1. KONTAKTSTHEORIEN UND KONTAKTVERMITTLUNG	2

2.1.1. KONTAKTSTHEORIEN UND KONTAKTVERMITTLUNG	2
2.1.2. KONTAKTSTHEORIEN UND KONTAKTVERMITTLUNG	2

2.1.3. KONTAKTSTHEORIEN UND KONTAKTVERMITTLUNG	2
--	---

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit

2.1.4. KONTAKTSTHEORIEN UND KONTAKTVERMITTLUNG	2
--	---

2.1.5. KONTAKTSTHEORIEN UND KONTAKTVERMITTLUNG	2
--	---

2.2. KONTAKTSTHEORIEN UND KONTAKTVERMITTLUNG	2
2.2.1. KONTAKTSTHEORIEN UND KONTAKTVERMITTLUNG	2

2.2.2. KONTAKTSTHEORIEN UND KONTAKTVERMITTLUNG	2
2.2.3. KONTAKTSTHEORIEN UND KONTAKTVERMITTLUNG	2
2.2.4. KONTAKTSTHEORIEN UND KONTAKTVERMITTLUNG	2
2.2.5. KONTAKTSTHEORIEN UND KONTAKTVERMITTLUNG	2

2.2.6. KONTAKTSTHEORIEN UND KONTAKTVERMITTLUNG	2
2.2.7. KONTAKTSTHEORIEN UND KONTAKTVERMITTLUNG	2
2.2.8. KONTAKTSTHEORIEN UND KONTAKTVERMITTLUNG	2
2.2.9. KONTAKTSTHEORIEN UND KONTAKTVERMITTLUNG	2

2.2.10. KONTAKTSTHEORIEN UND KONTAKTVERMITTLUNG	2
2.2.11. KONTAKTSTHEORIEN UND KONTAKTVERMITTLUNG	2
2.2.12. KONTAKTSTHEORIEN UND KONTAKTVERMITTLUNG	2
2.2.13. KONTAKTSTHEORIEN UND KONTAKTVERMITTLUNG	2

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM	2
2.1. DICHTEBESTIMMUNG BEI BAKTERIENSUSPENSIONEN	2
2.1.1. BESTIMMUNG DER ANZAHL KOLONIE - BILDENDER EINHEITEN (KBE)	2
2.1.2. OPTISCHE MESSUNGEN	3
2.1.3. GRAVIDIMETRISCHE MESSUNGEN	5
2.1.4. CHEMISCH-ANALYTISCHE MESSUNGEN	5
2.2. IMMUNMODULIERENDE WIRKUNGEN BAKTERIELLER ZELLWANDBESTANDTEILE	6
2.2.1. PEPTIDOGLYKAN	6
Chemischer Aufbau	6
Wirkungen	6
Toxizität	7
2.2.2. MURAMYLDIPEPTID	8
Chemischer Aufbau	8
Wirkungen	8
Toxizität	10
2.2.3. LIPOPOLYSACCHARID	10
Chemischer Aufbau	10
Wirkungen	11
Toxizität	14

	Seite
2.2.4. AUßERE MEMBRANPROTEINE	14
Chemischer Aufbau	14
Wirkungen	15
2.2.5. STAPHYLOKOKKEN PROTEIN A	16
Chemischer Aufbau	16
Wirkungen	16
2.2.6. TEICHONSAUREN	17
Chemischer Aufbau	17
Wirkungen	18
Toxizität	19
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	21
3.1. MATERIAL UND METHODEN	21
3.1.1. HERSTELLUNG DER KEIMSUSPENSIONEN	21
Bakterienstämme	21
Keimvermehrung	21
Dichteeinstellung	22
3.1.2. HERSTELLUNG DER KEIMLYSATE	23
Hitzelysierung	23
Hydrolyse	23
Enzymatische Aufspaltung	23
Gewinnung der Endotoxin-Rohfraktion	24
Gewinnung der Protein-Rohfraktion	24

3.1.3. STANDARDISIERUNG DER KEIMLYSATE	24
Extinktionsmessung	24
Proteinbestimmung	25
Lipopolysaccharidbestimmung	25
Säulenchromatographie	26
3.1.4. WIRKSAMKEITSPRÜFUNG	27
Infektionsbelastungsversuche	27
Tiere	27
Pseudomonas aeruginosa-Modell	27
Auswertung	28
Nachweis der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität	28
Chromium 51- (^{51}Cr) Freisetzungstest	28
Auswertung	29
3.2. ERGEBNISSE	30
3.2.1. EINFLUß DER LYSIERUNGSMETHODEN AUF DIE ZUSAMMENSETZUNG BAKTERIELLER LYSATE	30
Bestimmung des Proteingehaltes und der Extinktionswerte	30
Bestimmung des Lipopolysaccharidgehaltes	33
Bestimmung der Molekulargewichts- verteilung	33

	Seite
3.2.2. PARAMUNISIERENDE WIRKUNG VERSCHIEDENER BAKTERIELLER LYSATE	35
Infektionsbelastungsversuche	35
Spontane zellvermittelte Zytotoxizität	44
 4. <u>BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE</u>	 51
 5. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	 56
<u>SUMMARY</u>	57
 6. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	 58
 7. <u>DANKSAGUNG</u>	 76
 8. <u>LEBENS LAUF</u>	 77

1. EINLEITUNG

Bakterien besitzen immunmodulierende Eigenschaften sowohl bezüglich Stimulierung wie Supprimierung des Immunsystems. Die Träger dieser Eigenschaften sind vor allem Zellwandbestandteile wie Muramyl-dipeptid, Lipopolysaccharid, Teichonsäuren etc. (s. Schrifttum). Die standardisierte Herstellung von bakteriellen Immunmodulatoren bereitet relativ große Schwierigkeiten, da Bakterien unter wechselnden Einflüssen sehr stark bezüglich Wachstum, Zellwandstruktur, Lysisbereitschaft etc. variieren. Dadurch kommt es häufig zu großen Schwankungsbreiten der Wirksamkeit. Diese Schwierigkeiten haben dazu geführt, daß in den vergangenen Jahren bei der Entwicklung von bakteriellen Immunmodulatoren den Präparaten aus isolierten Zellwandbestandteilen der Bakterien der Vorzug gegeben wird. Diese "unitbezogenen" Immunmodulatoren haben aber gegenüber den Präparaten aus aufgeschlossenen "Ganzkeimen" häufig Nachteile bei der Stimulierung der paraspezifischen Infektabwehr bezüglich Wirksamkeit und Verträglichkeit.

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, die Herstellung von Paramunitätsinducern (paraspezifische Immunstimulantien) aus "Ganzkeimen" zu standardisieren. Dazu wurden Bakterien-suspensionen chemisch, thermisch oder enzymatisch aufgeschlossen und mittels LPS- und Proteinbestimmung, Extinktionsmessung und Säulenchromatographie standardisiert. Der Nachweis von paraspezifischen Wirkungen der Standardpräparate wurde im *Pseudomonas*-Infektionsmodell und im Zytotoxizitätstest geführt.



2. SCHRIFTTUM

2.1. STANDARDISIERUNGSMETHODEN ZUR HERSTELLUNG BAKTERIELLER PRÄPARATE

2.1.1. BESTIMMUNG DER ANZAHL KOLONIEBILDENDER EINHEITEN (KBE)

Bei Bakteriensuspensionen bietet sich die Dichtebestimmung durch die Ermittlung der Zahl koloniebildender Einheiten an. Für das Kochsche Gußplattenverfahren werden aus den einzelnen Verdünnungsstufen einer Bakteriensuspension definierte Mengen in eine sterile Petrischale gegeben, die mit ca. 10 ml eines bei 95-100 °C verflüssigten Nähragars gefüllt ist. Der Agar wird durch wiederholtes Schwenken gleichmäßig verteilt und nach dem Erstarren 48 Stunden bei 37 °C bebrütet. Anschließend werden die Kolonien gezählt und unter der Annahme, daß ein Keim sich zu einer Kolonie entwickelt, die Keimzahl bestimmt.

Beim Oberflächenverfahren werden 0,1 ml der Keimsuspension unter sterilen Bedingungen auf eine Agarplatte aufgebracht und mittels eines abgeflamten Spatels gleichmäßig über die Oberfläche verteilt. Nach 24-stündiger Bebrütung werden die sichtbaren Kolonien gezählt, wobei nur die Verdünnungsstufen ausgewertet werden, die eine Zahl von 20-200 Kolonien aufweisen. Die Zahl der Kolonien wird mit der jeweiligen Verdünnungsstufe multipliziert und, unter Berücksichtigung der Impfmenge, die Menge der kbE pro Maßeinheit berechnet.

Das "Most-Probable-Number" (MPN)-Verfahren beruht auf mathematisch-statistischen Überlegungen. Verdünnungsstufen der zu untersuchenden Suspension werden jeweils dreifach in Nährbouillon angesetzt und 24 Stunden bei 37 °C bebrütet. Über die durch das Wachstum der Keime verursachte Trübung der Bouillon wird der Titer berechnet. Zur genauen Feststellung der kbE wird die Anzahl der positiven Bouillonröhrchen

bei den drei höchsten Verdünnungsstufen bestimmt und anhand dieser dreistelligen Stichzahl mit den McGradyschen Tabellen die Zahl der kbE errechnet (Rolle und Mayr, 1984).

2.1.2. OPTISCHE MESSUNGEN

Die optische Dichtebestimmung kann mit zwei Meßverfahren durchgeführt werden: i) Extinktionsmessung und ii) Nephelometrie.

Bei der Extinktionsmessung wird die Absorption des einfallenden Lichtes gemessen, d.h. der Gesamtverlust der Strahlung beim Durchtritt durch eine Bakteriensuspension. Zu diesem Zweck sind Geräte entwickelt worden, die einen identischen Wirkungsmechanismus aufweisen und die als Extinktionsmesser bezeichnet werden. Im einzelnen gibt es die Thermosäulen, die nach dem Kompensationsprinzip arbeiten (Strauß, 1930), das Langekolorimeter (Enders und Kärnbach, 1937; Richards und Jahn, 1933), welches die Extinktion mittels Photozellen mißt, und das Pulfrichphotometer, ein Stufenphotometer (VEB Carl Zeiss Jena).

Unter Nephelometrie versteht man eine Trübungsmessung, bei der ausschließlich das Licht gemessen wird, das von festen, flüssigen oder gasförmigen Teilchen reflektiert wird, wenn diese Stoffe von einem Bündel paralleler Strahlen beleuchtet werden. Hierbei ist die Intensität des Streulichtes innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereiches der Zahl der suspendierten Teilchen proportional. Janke und Sorgo (1939) entwickelten das Pulfrichphotometer zum Trübungsmesser weiter. Mit Photozellen arbeiteten Frank (1932) sowie Andreev, Kudryashev und Stessel (1930), wobei Frank zwei Photozellen nach dem Kompensationsprinzip hintereinanderschaltete.

Durch Kombination der beiden Wirkungsprinzipien entwickelten Milatz und Rottier (1936) einen Trübungsmesser, der sich besonders zur Ermittlung von Wachstumskurven eignet.

Die erstmalige Trübungsmessung mit einem standardisierten Referenzpräparat führten Kendrick und Elderling (1935) bei der Herstellung einer Pertussis Vaccine durch. Das damalige Referenzpräparat, das zur Erstellung eines international gültigen Trübungsstandards diente, bestand aus Pyrex Glaspartikeln, die in Glasampullen eingeschweißt wurden. Heute verwendet man als Standard, aufgrund der höheren Stabilität des Materials, eine Mischung der zwei Kunststoffpolymere Polystyren und Polymethylmethacrylat (Perkins et al., 1973). Es besteht aber auch derzeit noch kein internationales Übereinkommen zur Verfahrenstechnik bei der Dichtemessung von bakteriellen Suspensionen.

In einer gemeinsamen Studie untersuchten 10 verschiedene Labors mit visuellen Methoden die Dichte von acht unterschiedlichen Bakteriensuspensionen im Vergleich zu einem Standardpräparat. Die optische Dichte wurde entweder durch Inspektion im einfallenden Sonnenlicht oder über die Ermittlung des Kontrastes beim Lesen von schwarzen Lettern gemessen. Die Varianz betrug 10 %. Damit erwies sich die visuelle Methode als sehr zuverlässig zur Dichtebestimmung (Perkins et al., 1973). Bei der Festlegung des Bakteriengehaltes einer Cholera Vaccine korrelierte dagegen die Anzahl koloniebildender Einheiten (kBE) linear mit den Dichtewerten, die photometrisch bestimmt wurden. Visuell ermittelte Daten zeigten diese klare Abhängigkeit nicht. Wichtig ist die sofortige Messung der Dichte (innerhalb von 2 - 6 Stunden) nach der Bakterienernte, da die optische Dichte zu diesem Zeitpunkt höhere Werte bringt (Pittman et al., 1974). Die Menge an frischgeernteten *Bordetella pertussis* Keimen ist bei gleicher optischer Dichte um ca. ein Drittel geringer als die von älteren Keimsuspensionen (Pittman, 1976).

2.1.3. GRAVIDIMETRISCHE MESSUNGEN

Bei der Bestimmung des Gewichtes bakterieller Suspensionen wird grundsätzlich zwischen Feucht- und Trockengewicht unterschieden. Das Feuchtgewicht wird unmittelbar nach der Bakterienernte ermittelt, wobei die Menge an zugesetzter Nährflüssigkeit bekannt sein muß. Das Trockengewicht ermittelt man erst nach fertiger Präparation der Bakterien. Hierbei werden die Suspensionen entweder unter Wärmeeinwirkung getrocknet oder sie werden lyophilisiert. Das Trockengewicht ist aber zur Feststellung der Bakterienmenge nicht geeignet, da zwischen dem Trockengewicht und der Zahl der vermehrungsfähigen Bakterien kein gesetzmäßiger Zusammenhang besteht (Wohlfel, 1933). Freudenstein und Passing (1981) untersuchten bei der Produktion von BCG Vaccinen den Einfluß von Trocken- und Feuchtgewicht auf die Gesamtzahl der gewonnenen Bakterien. Sie kamen zu dem Schluß, daß die Gewichtsermittlung keine genaue Methode zur Bestimmung des Bakteriengehaltes ist.

2.1.4. CHEMISCH-ANALYTISCHE MESSUNGEN

McCauley et al. (1981), Helting und Kumpe (1978) sowie Wong et al. (1977) wählten zur Standardisierung von Polysaccharid Vaccinen die präparative Gelchromatographie; Wong et al. bestimmten zudem den Gehalt an Phosphat, Protein und Nukleinsäuren. Die Messung des Stickstoffgehaltes diente Pittman et al. (1974) zur Erfassung der Bakterienmenge einer Cholera Vaccine; Merle, Robbel und Hungerer (1984) bestimmten den Protein- und Kohlenhydratanteil einer Pseudomonas Vaccine. Einzelne Proteinkomponenten wurden mit einer SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-Page) dargestellt.

2.2. IMMUNMODULIERENDE WIRKUNGEN BAKTERIELLER ZELLWAND-BESTANDTEILE

2.2.1. PEPTIDOGLYKAN

Chemischer Aufbau

Peptidoglykan (PG), auch Murein oder Glykopeptid genannt, besitzen alle medizinisch bedeutsamen Bakterienarten. Es besteht aus langen Polysaccharidketten, die über Peptide quervernetzt sind. Bei grampositiven Bakterien mit ihrer sehr kompakten Zellhülle hat das PG einen Anteil von bis zu 90 % am gesamten Gewicht. Der Glykananteil besteht aus β -1,4-gebundenen N-Acetylglukosamin- und N-Acetylmuraminsäurebausteinen. Im Gegensatz zu dieser konstanten Struktur bildet der Peptidanteil den variablen Abschnitt. Eine aus vier Aminosäuren bestehende Peptiduntereinheit stellt die Grundeinheit dar, die unterschiedlichen Aminosäuresequenzen sind für die Variabilität des PG bei den verschiedenen Bakterienarten verantwortlich. Die beiden Anteile sind entweder direkt (z.B. bei *Staph. aureus*) oder über Brückenpeptide vernetzt. Das PG verleiht den Bakterien ihre Stabilität. Während bei gramnegativen Bakterien noch eine äußere Membran aufliegt, bildet das PG bei grampositiven die abschließende Hülle. Es ist bei grampositiven Keimen wesentlich stärker ausgebildet (Seltmann, 1982; Heymer, Seidl und Schleifer, 1985).

Wirkungen

Humane periphere B-Lymphozyten und Milzlymphozyten der Maus werden durch Zugabe von Staphylokokken-PG zum Wachstum angeregt (Dziarski und Dziarski, 1979). PG von *Escherichia coli* und *B. megaterium* wirkt ebenfalls mitogen für Milz-

zellen. Die mitogene Wirkung wird polyklonal vermittelt (Räsänen und Arvilommi, 1981; Räsänen, Mustikkamäki und Arvilommi, 1982). Das PG besitzt auch eine Adjuvanswirkung, es verstärkt die Antikörperproduktion gegen ein Proteinantigen (Damais et al., 1975). Diese Wirkung ist dosisabhängig (Levinson et al., 1983; Babu und Zeiger, 1983).

Die zelluläre Immunität wird ebenfalls durch PG beeinflusst. Beim Kaninchen werden durch Applikation von wasserlöslichem PG periphere Lymphozyten zum Wachstum stimuliert (Jolles et al., 1975). Auch diese mitogene Wirkung wird polyklonal vermittelt (Räsänen und Arvilommi, 1981; Räsänen, Mustikkamäki und Arvilommi 1982). Appliziert man Meerschweinchen PG, verstärkt sich die Allergie vom Spättyp. Diese Reaktion wird durch T-Lymphozyten vermittelt (Jolles et al., 1975).

Durch PG-Applikation werden lösliche Mediatoren freigesetzt. Humane T-Lymphozyten werden zur Freisetzung von Leukozyteninhibitor-Faktor (LIF) angeregt (Räsänen, Mustikkamäki und Arvilommi, 1982). Bei der Maus werden Makrophagen zur Sekretion von Leukozyteninhibitor-Faktor (LIF) stimuliert (Vacheron, Guenounou und Nauciel, 1983).

Humane periphere mononukleäre Zellen werden durch PG von Staphylokokken- und Bacillusarten polyklonal aktiviert (Levinson et al., 1983). Die Stimulierung von murinen Makrophagen zur Produktion löslicher Mediatoren wurde bereits genannt (Vacheron, Guenounou und Nauciel, 1983).

Toxizität

Die intradermale Injektion von PG führt beim Kaninchen zu akuten, nekrotischen Läsionen. Diese Eigenschaft wird durch Ultraschallbehandlung oder Lysozymverdauung des PG stark reduziert (Abdulla und Schwab, 1966). Bei Meerschweinchen und Ratten entsteht keine Nekrose, hier bildet sich an

der Injektionsstelle lediglich ein Erythem aus (Wachsmuth, 1979). Pyrogen wirkt die intravenöse Applikation von PG, jedoch sind dazu Dosen nötig, die um den Faktor 100-1000 höher liegen als bei LPS (Heymer und Rietschel, 1977). Bei Ratten wurde nach einer i.v.-Injektion die Ausbildung einer akuten, generalisierten Arthritis beobachtet (Fox et al., 1982).

2.2.2. MURAMYL-DIPEPTID

Chemischer Aufbau

Muramyl-Dipeptid (MDP) ist die Grundeinheit des Peptidoglykans. Es wurde 1975 als minimale wirksame Struktur des kompletten Freundschens Adjuvans (kFA) isoliert (Adam et al., 1975; Kotani et al., 1975). Seitdem wurden mehrere hundert synthetische Analoga hergestellt.

Wirkungen

Einen Überblick über die vielfältigen immunmodulierenden Wirkungen des MDP gibt Tabelle 1.

MDP verstärkt die Antikörperproduktion bei gleichzeitiger Gabe mit einem Antigen. Appliziert man Kaninchen ein synthetisches MDP-Derivat, das Murabutid (i.v., 10 mg/kg Körpergewicht), tritt kein Fieber auf. Die Adjuvanswirkung bleibt bestehen (Chedid et al., 1982).

MDP provoziert die Freisetzung löslicher Mediatoren. Murine Makrophagen werden direkt zur Produktion von löslichen Mediatoren stimuliert (LeClerc und Chedid, 1986). Sowohl in vivo als auch in vitro wird die Produktion von Interleukin-1 (IL-1) in Lymphozyten angeregt (Bahr, Chedid und Behbehani, 1987).

Tab. 1: Immunmodulierende Wirkungen von MDP (modifiziert nach Parant, 1980; Kotani et al., 1982; Chedid, 1982)

Stimulierung der humoralen Immunantwort	Mitogen für B-Lymphozyten Polyklonale Induktion von IgG ₁ , IgG ₂ und IgG _E Adjuvanswirkung
Stimulierung der zellulären Abwehr	Mitogen für T-Lymphozyten Stimulation der Differenzierung Stimulierung der T _H -Zellaktivität Induktion von zytotoxischen T-Zellen Stimulierung der Mixed Lymphocyte Reaction
Stimulierung der Mediatorfreisetzung	Kolonie-stimulierender Faktor Interleukin 1 Fibroblasten-aktivierender Faktor B-Zell-aktivierender Faktor Prostaglandine Serotonin
Stimulierung des Retikuloendothelialen Systems	Makrophagen Stimulierung der Phagozytose Chemotaktische Wirkung Steigerung der cAMP-Produktion
Komplementaktivierung	
Steigerung der unspezifischen Tumorabwehr	Induktion aktivierter Makrophagen Induktion der NK-Zellen

Bei der immunstimulierenden Wirkung des MDP nehmen Makrophagen eine zentrale Rolle ein. Die Aktivierung der Zellen erfolgt nach Endozytose des MDP. An der Makrophagenmembran sind keine MDP-Rezeptoren vorhanden (Özel und Masihi, 1987). Zwischen der Adjuvanswirkung und der Fähigkeit zur Makrophagenstimulierung besteht eine positive Korrelation (Bahr, Chedid und Behbehani, 1987).

Die Verstärkung der unspezifischen Abwehr gegenüber bakteriellen Infektionen beschreiben Chedid et al. (1982). Durch Inkorporation von MDP in Liposomen wird diese Wirkung um das 10-15-fache verstärkt. So werden immundefiziente Mäuse durch eine einmalige i.v.-Injektion mit inkorporiertem MDP vor einem sonst tödlichen *Salmonella typhimurium*-Challenge wirksam geschützt (Phillips und Chedid, 1987).

Toxizität

Die toxischen Wirkungen des MDP entsprechen im wesentlichen denen des PG; das MDP ist ein wichtiges Strukturelement im toxischen Wirkungsprinzip des Peptidoglykan (Kotani et al., 1981). Inzwischen wurden mehrere hundert synthetische Derivate des MDP hergestellt mit dem Ziel, die toxischen Wirkungen auszuschalten (Chedid und Audibert, 1984).

2.2.3. LIPOPOLYSACCHARID

Chemischer Aufbau

Das Lipopolysaccharid (LPS) ist ein amphipatisches Molekül, das mit dem hydrophoben Anteil in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien verankert ist. Die Grundstruktur umfaßt drei Regionen:

(i) das O-Antigen, auch somatisches Antigen genannt, das eine langkettige Polysaccharidstruktur sich wiederholender Zuckerbausteine darstellt. Diese Struktur bildet die morphologische Grundlage der Serotypisierung;

(ii) die Oligosaccharidhülle, welche aus ca. 10 Monosacchariden besteht;

(iii) das Lipid A, das eine aus β -1.6-Bindungen verknüpften Diglucosaminen bestehende, einheitlich strukturierte Basis aufweist. Das Lipid A ist für die meisten biologischen und toxischen Eigenschaften des LPS verantwortlich (Lüderitz et al., 1984; Hitchcock et al., 1986).

Wirkungen

Das LPS hat vielfältige Wirkungen auf das Immunsystem. Die Wirkungen sind in Tabelle 2 zusammenfassend dargestellt.

Chedid et al. (1975) beschreiben die mitogene Wirkung des LPS auf das humorale Immunsystem. LPS regt Lymphozyten der Maus zur Blastogenese an. Die Zielzellen sind B-Lymphozyten. Da auch O-Antigen-freie LPS-Mutanten denselben Effekt bringen kann man davon ausgehen, daß die mitogene Wirkung nicht antigenabhängig ist (Peavy, Baughn und Musher, 1978). Der wirksame Bestandteil des LPS ist das Lipid A. Mäuse des Stammes C3H/HeJ sind aufgrund eines genetischen Merkmales gegenüber den Wirkungen des Lipid A unempfindlich. Appliziert man diesen Mäusen LPS, so werden die Lymphozyten nicht zur Blastogenese angeregt (Skidmore et al., 1975). Der Adjuvanseffekt des LPS tritt nur dann auf, wenn die LPS-Gabe nach Verabreichung des Antigens erfolgt. Eine LPS-Vorbehandlung übt den gegenteiligen Effekt aus (Hadden, Delmonte und Oettgen, 1977).

Mit LPS kann man auch die Freisetzung von löslichen Mediatoren stimulieren. Durch LPS wird die Freisetzung des Makrophagen-aktivierenden Faktors (MAF), eines Lymphokins, gesteigert (Weinberg, Chapman und Hibbs, 1978). LPS hat einen aktivierenden Effekt auf die Freisetzung des

Lymphokins Interleukin-1 (IL-1; Lymphozyten-aktivierender Faktor). Durch Inkorporation von LPS und isoliertem Lipid A in Liposomen wird diese Wirkung gemindert, d.h. daß der Wirkungsmechanismus nicht auf einer hydrophoben Wechselwirkung mit den Zielzellen beruht (Dijkstra et al., 1987). Das LPS stimuliert auch die Freisetzung von α - und β - Interferon (Friedman et al., 1987) sowie von γ -Interferon (Okamura et al., 1987).

Peritonealmakrophagen der Maus reifen nach Stimulierung durch LPS zu tumorlysierenden Zellen. Sind die Makrophagen transient BCG-infiziert, so werden zur Stimulation geringere LPS-Mengen benötigt (Weinberg, Chapman und Hibbs, 1978). Makrophagen bilden bei der Tumorlysis das Enzym Plasminogen-Aktivator. Dieses Enzym entfaltet seine zytotoxische Wirkung erst in Anwesenheit von LPS (Jones et al., 1984). Die Aktivierung von Makrophagen ist sowohl auf eine unmittelbare Interaktion zwischen den Zellen und LPS zurückzuführen, als auch auf die Anregung des kolonie-stimulierenden Faktors (KSF). Dieser myeloproliferative Faktor stimuliert die klonale Proliferation und Differenzierung von Makrophagen-Vorläuferzellen (Moore et al., 1980). Bei der Makrophagen-aktivierung sind auch Lymphokine beteiligt, die eine Sensibilisierung der Makrophagen gegenüber LPS induzieren (Pace und Russel, 1981). LPS steigert die Aktivität von Natural-Killer-Zellen (NK-Zellen) (Nowotny et al., 1982).

Das Komplement wird durch LPS über den klassischen und über den alternativen Weg aktiviert. Die Aktivierung des klassischen Weges erfolgt einerseits durch LPS-Antikörper-Komplexe (Möller und Michael, 1971), zum anderen durch einen antikörperabhängigen Prozeß, bei dem das Lipid A direkt an das Komplement C1 gebunden wird. Der alternative antikörperunabhängige Weg wird direkt über Aktivierung des C3 durch den Polysaccharidanteil des LPS angeregt (Morrison und Kline, 1977).

Tab. 2: Immunmodulierende Wirkungen des LPS (modifiziert nach Behling, 1983; Friedman, Specter und Butler, 1983)

Stimulierung der humoralen Immunantwort	Mitogen für B-Lymphozyten Polyklonale Induktion der Antikörperproduktion Adjuvanswirkung
Stimulierung der zellulären Immunabwehr	Stimulierung von T _H -Zellen Stimulierung von T _S -Zellen Induktion zytotoxischer Effektorzellen Stimulation der Mixed Lymphocyte Reaction
Stimulierung der Mediatorfreisetzung	Kolonie-stimulierender Faktor Interleukin-1 Interferone Tumor-nekrotisierender Faktor Properdin Opsonin Prostaglandine Glucocorticoid-antagonisierender Faktor
Stimulierung des Retikuloendothelialen Systems	Makrophagen Steigerung der Phagozytose Steigerung der Zytotoxizität Neutrophile Leukozyten Enzymfreisetzung
Komplementaktivierung	
Steigerung der unspezifischen Tumorabwehr	

Toxizität

Den o.g. Wirkungen steht die hohe Toxizität des LPS gegenüber. LPS ruft bei vielen Tieren Fieber hervor. (Siebert, 1923). Weitere Wirkungen sind die Provokation einer Leukopenie, der lokalen und generalisierten Schwartzman-Reaktion und einer Blutdrucksenkung. Bei Mäusen wirkt die i.v.-Injektion von LPS letal (Kadis, Weinbaum und Ajl, 1971). Verschiedene Stoffwechselstörungen und anaphylaktische Reaktionen kommen ebenfalls vor (Mayr, Eissner und Mayr-Bibrack, 1984). Durch Detoxifizierung versucht man diese nachteiligen Eigenschaften unter Beibehaltung der positiven Wirkungen auszuschalten. Dies erreicht man u.a. mittels einer milden alkalischen Hydrolyse (Chedid et al., 1975) und durch Bindung des Lipid A an das zyklische Peptidantibiotikum Polimyxin B (Jacobs und Morrison, 1977). Nerkar und Bandekar (1986) beschreiben die Detoxifizierung mittels Gammabestrahlung. Munford und Hall (1987) konnten erstmals das LPS mit einem Enzym entgiften, der aus menschlichen Neutrophilen isolierten Acyloxyacyl-Hydrolase.

2.2.4. AUßERE MEMBRANPROTEINE

Chemischer Aufbau

Die äußeren Membranproteine (OMP) werden unterteilt in Hauptproteine (major proteins) und Nebenproteine (minor proteins). Diese Unterscheidung richtet sich nach rein quantitativen Gesichtspunkten.

Unter den Hauptproteinen finden sich die Porine, die im wesentlichen der Regulierung von Diffusionsvorgängen dienen. Porine sind Matrixproteine, die in einer engen Verbindung zur darunterliegenden Peptidoglykanschicht stehen. Sie haben einen hohen Anteil an β -Faltblattstruktur. Aufgrund der ge-

trennten genetischen Kodierung der Proteinsynthese können mehrere Untereinheiten unterschieden werden.

Ein weiterer Bestandteil der OMP, das Protein II (outer membrane protein A, ompA), besitzt ein Molekulargewicht von ca. 30000. Bei der Plasmidkonjugation bildet das Protein II die Verbindungsstelle zwischen Donor- und Rezipientenstamm.

Das Lipoprotein liegt in einer kovalent an die Peptidoglykanschicht gebundenen und in einer freien Form vor. Seine Funktion besteht darin, die Integrität der äußeren Membran zu gewährleisten. Zudem ist es an vitalen Prozessen von Zellwachstum und -vermehrung beteiligt.

Die Nebenproteine haben Rezeptorfunktionen und sind am transmembranalen Austausch von Nährstoffen beteiligt. 10-20 verschiedene Nebenproteine sind in der äußeren Membran gram-negativer Keime vorhanden (DiRienzo, Nakamura und Inouye, 1978; Seltmann, 1982).

Wirkungen

Die äußeren Membranproteine sind Mitogene für B-Lymphozyten der Maus (Melchers, Braun und Galanos, 1975; Bessler und Henning, 1979; Chen, Hancock und Mishell, 1980; Goldman, White und Leive, 1981). Die Porine sind zudem in der Lage, humane B-Lymphozyten zur Produktion von Immunglobulinen zu stimulieren (Vordermeier, Drexler und Bessler, 1987). Spaltet man Porine von *Salmonella typhimurium* mit Zyanogenbromid auf, so erhält man mehrere Bruchstücke. Das Bruchstück mit dem Molekulargewicht 24000 hat eine mitogene Wirkung auf B-Lymphozyten (Vordermeier, Stäb und Bessler, 1986). Da dieses Protein keinen Lipidanteil besitzt, erfolgt die Bindung an die Lymphozytenmembran über spezifische Bindungsmechanismen. Dies trifft auch für das Protein II zu (Bessler und Henning, 1979). Im Gegensatz dazu finden die Wechselwirkungen zwischen dem Lipoprotein und B-Lymphozyten unter Einbezie-

hung des Fettsäureanteiles statt; verschiedene Mechanismen erzeugen also dieselbe Wirkung (Bessler et al., 1977).

Ein sogenanntes lösliches Protein aus der Zellwand von *Listeria monocytogenes* löst je nach Art der Fraktionierung eine antigenbedingte T-Zellproliferation oder die Differenzierung von B-Lymphozyten aus (Wentworth und Ziegler, 1987).

Außere Membranproteine von *Salmonella typhimurium* binden sich an die Membranen von murinen Peritonealmakrophagen. Durch diese Bindung werden die Makrophagen zur Lysis von Tumorzellen angeregt (Weinberg, Ribl und Wheat, 1983). Auch nach Hitze- und Enzymbehandlung kann diese Bindung nachgewiesen werden, während die stimulierende Wirkung verlorengeht. Die polyklonale Aktivierung und die Bindung scheinen unterschiedlichen Mechanismen zu unterliegen (Sager et al., 1984).

2.2.5. STAPHYLOKOKKEN PROTEIN A

Chemischer Aufbau

Die meisten *Staphylococcus aureus*-Stämme besitzen ein Protein mit einem Molekulargewicht von 41000 Dalton. Dieses Staphylokokken Protein A (SPA) existiert sowohl in einer zellwandgebundenen Form, als auch ungebunden als lösliches Protein. Aufgrund der Fähigkeit an die Fc-Region des Immunglobulin G (IgG) der meisten Säugetiere zu binden, kann SPA durch Chromatographie an immobilisiertem IgG eluiert werden, andererseits aber auch zur Isolierung von IgG genutzt werden (Hjelm, Hjelm und Sjöquist, 1972; Inouye, 1979; Seltmann, 1982).

Wirkungen

SPA hat eine starke mitogene und Adjuvanswirkung. Es

steigert polyklonal die Antikörperproduktion der B-Lymphozyten (Forsgren, Svedjelund und Wigzell, 1976; Banck und Forsgren, 1978; Räsänen et al., 1980). Humane B-Lymphozyten produzieren nach Stimulation durch SPA α -Interferon, während murine Lymphozyten der Milz zur Produktion von α - und β -Interferon angeregt werden (Smith, Johnson und Blalock, 1983).

Blutlymphozyten des Menschen sezernieren nach Inkubation mit SPA Gamma-Interferon, welches sowohl natürliche Killerzellaktivität (NK), als auch eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität aufweist (Catalona, Ratliff und McCool, 1981). Diese Wirkungen sind nicht von Makrophagen abhängig, wie dies bei anderen Mitogenen der Fall ist (Ratliff, McCool und Catalona, 1981).

In einem Rattenmodell führt die i.v.-Applikation von SPA zur Verringerung von Adenokarzinomzellen (Ray und Bandyopadhyay, 1983). Hierbei kommt es zu einem signifikanten Anstieg des IgG-Gehaltes im Blut. Die Zytotoxizität von peripheren mononukleären Zellen erhöht sich. Diese Eigenschaft kann durch Spenderplasma übertragen werden.

Gelegentlich wird dem SPA eine T-Zellaktivierende Wirkung zugesprochen. Diese beruht auf einer Verunreinigung mit Staphylokokken-Enterotoxin A, welches eine sehr hohe mitogene Potenz besitzt (Smith, Johnson und Blalock, 1983).

2.2.6. TEICHONSÄUREN

Chemischer Aufbau

Als Teichonsäuren (TS) bezeichnet man alle Zellwand-, Kapsel- und Membranpolymere grampositiver Bakterien, die Glycerolphosphat oder Ribitolphosphat enthalten. Sie kommen in fast allen grampositiven Bakterien vor. Strukturell

unterschieden werden TS die membranassoziiert vorliegen, und TS die kovalent an Peptidoglykan gebunden vorkommen. Erstere zeichnen sich durch einen sehr einheitlichen Aufbau aus, welcher aus einer Glycerolphosphat-Grundstruktur besteht, bei der die zweite Hydroxylgruppe variable Bindungspartner aufweist. Normalerweise sind hier D-Alaninester gebunden. Diese Teichonsäuren sind fast ausnahmslos an Glykolipide gebunden und werden als Lipoteichonsäuren (LTS) bezeichnet.

Die Peptidoglykan- oder Wand-assoziierten TS sind von sehr heterogener Struktur. Diese Polymere besitzen Phosphodiestergruppen, Polyole und/oder Zuckerreste sowie meistens D-Alaninester. Die einfachsten Formen sind die klassische Glycerolteichonsäure sowie die Ribitolteichonsäure, bei der Glycerol durch Ribitol ersetzt wird (Knox und Wicken, 1973; Seltmann, 1982;).

Wirkungen

Uneinheitlich sind die Ergebnisse über die Aktivierung einzelner Lymphozytenpopulationen durch LTS. Räsänen und Arvilommi (1981) sowie Hamada et al. (1985) weisen die polyklonale Aktivierung von humanen und murinen B-Lymphozyten nach. Zudem wird bei Mäusen durch Zugabe von LTS zu einem Antigen die Antikörperproduktion verstärkt. Entfernt man den Lipidteil des LTS, wird die mitogene Wirkung für B-Lymphozyten schwächer. Hier spielt die starke unspezifische Membranbindungsfähigkeit der LTS eine wesentliche Rolle, die bei deacylierten TS abgeschwächt wird (Hamada et al., 1985). Dziarski, Dziarski und Levinson (1980) fanden keine mitogenen Effekte von Lipoteichonsäuren auf Lymphozyten von Maus, Ratte und Mensch. Die Bindung von LTS an menschliche und murine T-Lymphozyten mit dosisabhängiger mitogener Wirkung beschreiben erstmals Beachey et al. (1979).

Isolierte humane mononukleäre Zellen werden durch LTS zur Blastogenese angeregt (Aasjord, Nyland und Matre, 1986).

In vitro stimuliert LTS Peritonealmakrophagen der Maus zur Lysis von Tumoren. Dieser Effekt geht nach Deacylierung des LTS verloren (Hamada et al., 1985). LTS unterdrückt beim Menschen und bei der Maus die durch Lymphozyten hervorgerufene Zytotoxizität. Die Wirkung des LTS ist dosisabhängig (Whigham und Kleinmann, 1983).

1978 wiesen Wilkinson et al. die Komplementaktivierung durch TS über den klassischen Weg nach. Die Wirkung von peptidoglykangebundener TS übertrifft den Effekt von LTS. Die Komplementaktivierung durch LTS auf dem alternativem Weg wurde erstmals von Hummel et al. (1985) beschrieben. Hierbei spielt die Membranbindungsfähigkeit von LTS eine wesentliche Rolle. Die Untersuchungen betreffen das Komplementsystem des Menschen und des Meerschweinchens.

Behandelt man Mäuse mit LTS, die mit *Propionibacterium acnes*-Keimen infiziert sind, so tritt im Serum ein hoher Spiegel des Tumornekrose-Faktors auf. In vivo löst dieser Faktor die hämorrhagische Lysis eines Fibrosarkoms aus (Yamamoto et al., 1985).

Toxizität

Über die toxischen Eigenschaften der TS besteht keine einheitliche Meinung. Der mitogene Effekt von Peptidoglykan auf B-Lymphozyten wird durch höhere Konzentrationen von LTS toxisch unterdrückt (Dziarski, Dziarski und Levinson, 1980). Milzzellen von Mäusen werden durch Zugabe von mehr als 10 µg TS zur Kultur irreversibel geschädigt (Bolton, 1981). Andererseits ist die Unterdrückung zytotoxischer Reaktionen beim Menschen und bei der Maus durch LTS nicht auf einen toxischen Effekt der LTS zurückzuführen, denn die Effektorzellen behalten ihre Vitalität. Dieser Effekt ist ein aktiver Unterdrückungsmechanismus, wahrscheinlich hervorgerufen durch Stimulierung von T_H-Zellen durch die Teichonsäure (Whigham und Kleinmann, 1983). In einer Studie wurden die

Wirkungen einer i.v. LTS- und LPS-Injektion bei Mäusen verglichen. Eine Dosis von 20 mg LTS hatte keine letale Wirkung, dagegen riefen 500 µg LPS eine Mortalität von 100 % hervor (Yamamoto et al., 1985).

Die teilweise widersprüchlichen Angaben beruhen auf unterschiedlichen Extraktionsmethoden zur Gewinnung der Teichonsäuren und auf der Verwendung verschiedener Bakterienstämme. Zudem ist die Reindarstellung der Teichonsäuren sehr schwierig (Chorpenning, 1985).

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. MATERIAL UND METHODEN

3.1.1. HERSTELLUNG DER KEIMSUSPENSIONEN

Bakterienstämme

Folgende Bakterien aus der institutseigenen Stammsammlung wurden verwendet:

Bordetella (B.) *bronchiseptica*-Stamm Nr. 2,

Escherichia (E.) *coli* O15-Stamm,

Escherichia (E.) *coli* O101:K99-Stamm und

Pasteurella (P.) *hämolytica* A₁-Stamm.

Die lyophilisierten Bakterienstämme wurden bei 4 °C in Ampullen aufbewahrt.

Keimvermehrung

Nach Resuspendierung wurden die Keime auf Blutagar verimpft (24 Std., 37 °C), mit 3 ml physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und in einem Fermenter (New Brunswick) vermehrt. In dem 25 Liter fassenden Fermentertank wurden die Keime 18 Stunden bei 37 °C in Standard-I-Medium (Merck) bebrütet. Während der Bebrütung wurde die Bouillon ständig gerührt und begast. Die 1:20 eingeeengte Keimsuspension (3000 U/min, 30 min) wurde vor Gebrauch zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen (4000 U/min, 15 min.).

Dichteeinstellung

Die Einstellung der Keimsuspensionen mit physiologischer Kochsalzlösung auf eine definierte Dichte erfolgte nach zwei Methoden. Zum einen wurde die Dichte der Suspensionen mit einem Bariumsulfat-Standard (96 + 4) verglichen. Diese Überprüfung erfolgte visuell, wobei beim Durchschauen durch die Suspensionen der Kontrast von schwarzen Lettern hinter den Keimaufschwemmungen mit dem des Bariumsulfat-Standards verglichen wurde. Mit einer instrumentellen Messung der Extinktion mit einem Photometer (Eppendorf, 1101 M) bei einer Wellenlänge von 578 nm wurde das Ergebnis überprüft. Der Extinktionswert lag bei 0,5. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (kbE) der bakteriellen Ausgangssuspensionen sind Tabelle 3 zu entnehmen. Die Keimzahlbestimmung erfolgte innerhalb eines Zeitraums von maximal 5 Std. nach Ernte der Bakterien.

Tab. 3: Zahl der koloniebildenden Einheiten (kbE) der bakteriellen Ausgangssuspensionen¹

Bakterienstamm	Bariumsulfat- dichte	Extinktion (578 nm)	Zahl der kbE (pro ml)
E. coli O101	96 + 4	0,5	1,5 x 10 ⁶
E. coli O 15	96 + 4	0,5	1,5 x 10 ⁶
B. bronchiseptica	96 + 4	0,5	1,0 x 10 ⁶
P. haemolytica	96 + 4	0,5	8,0 x 10 ⁶

¹: Keimzahlen ermittelt mit dem Oberflächenverfahren

3.1.2. HERSTELLUNG DER KEIMLYSATE

Hitzelysierung

Die Keimsuspensionen wurden in einer Menge von je 100 ml in Erlenmeyer-Kolben abgefüllt und in einem Wasserbad erhitzt (80 Grad, 10 min.).

Hydrolyse

Die Keimsuspensionen wurden zu je 100 ml in weithalsige Erlenmeyer-Kolben mit Magnetrührern gefüllt. Unter ständigem Rühren wurde nun tropfenweise aus einer Bürette in NaOH bzw. in HCl dazugegeben, bis die Suspensionen einen pH-Wert von 12,0 bzw. 2,0 hatten. Anschließend wurden die Suspensionen 24 Stunden bei 37 °C im Brutraum ständig geschüttelt. Zuletzt erfolgte die Gegentitration mit der entsprechenden Säure bzw. Lauge auf pH-Werte von 7,4. Die pH-Werte wurden mit einem Beckmann-pH-Meter kontrolliert.

Enzymatische Aufspaltung

Den Keimsuspensionen wurden 1000 Einheiten/ml Lysozym zugesetzt (Egg Lysozym, Merck). Bei dem Lysozym handelte es sich um eine frisch angesetzte Lysozym-NaCl-Lösung mit 100000 Einheiten Lysozym/ml. Der Ansatz wurde 24 Stunden bei 37 °C im Brutraum unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Keimsuspensionen zur Abtötung der noch nicht lysierten Keime einer 10-minütigen Hitzebehandlung im Wasserbad bei 80 Grad unterzogen.

Gewinnung der Endotoxin-Rohfraktion (nach Westphal, Lüderitz und Bister, 1952)

Die bakteriellen Lysate wurden bei +2°C mit dem doppeltem Volumen einer kalten 75 %igen Phenol-Wassermischung versetzt. Nach kräftigem Schütteln wurde das Gemisch 20 min bei +5°C inkubiert. Durch die anschließende Zentrifugation bei +4°C (35000 U/min, 30 min) trennte sich die Probe in eine obere wässrige Phase, die das Endotoxin enthielt, und eine untere Phenolphase. Die obere Phase wurde zwei Tage gegen fließendes Leitungswasser und anschließend einen Tag bei +4°C gegen Aqua dest. dialysiert.

Gewinnung der Protein-Rohfraktion (modifiziert nach Bhaduri und Demchick, 1983)

Zur Gewinnung der Proteine wurden 20 ml eines Lysats bei +4°C zentrifugiert (7000g, 15 min.) und das Pellet in 10 ml kalter Acetonlösung aufgenommen. Diese Suspension wurde 5 min. auf Eis inkubiert und die Fraktion durch erneute Zentrifugation gesammelt. Überschüssiges Aceton wurde im Unterdruck entfernt und die Proteine dann mit 1 ml einer 0,5 %igen NP 40-Lösung extrahiert. Eine anschließende 24-stündige Dialyse gegen PBS beendete das Extraktionsverfahren.

3.1.3. STANDARDISIERUNG DER KEIMLYSATE

Extinktionsmessung

Nach Herstellung der Lysate wurde mit einem Eppendorf-Photometer bei einer Wellenlänge von 578 nm die Extinktion mit Halb-Mikro Küvetten (Greiner) gemessen.

Proteinbestimmung

Die Messung der Proteinmenge wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. Nach Anfertigung einer Eichkurve mittels Eppendorf-Photometer (1101 M) mit humanem Serumalbumin als Standard bei einer Wellenlänge von 578 nm und einem Probenvolumen von 200 µl wurde der Extinktionswert der einzelnen Proben bestimmt. Jede Messung erfolgte im Doppelansatz.

Lipopolysaccharidbestimmung

Zur Ermittlung des LPS-Gehaltes wurde der Limulus-Nachweis herangezogen. Es wurde Limulus Amöbozyten-Lysat (L.A.L.) mit einer Empfindlichkeit von 0,9 - 1,0 EU/ml (0,09 - 0,1 ng/ml) der LPS-Labortechnik Schulz verwendet. Ein Untersuchungsgang gliederte sich in drei Abschnitte.

i) Überprüfung der Lysatempfindlichkeit (Bickel und Meyer, 1981)

Hierzu wurde ein LPS-Standard (*E. coli*, 1ng/ml) bis zu einer Konzentration unterhalb der angegebenen Empfindlichkeit mit Aqua ad injectabile (Ampuwa, Fresenius) in geometrischer Reihe in vierfachem Ansatz verdünnt und die letzten noch positiven Verdünnungsstufen vermerkt.

ii) Probenvorbereitung

Die Proben wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen eine Stunde bei 80 Grad inkubiert. Damit wurde die Wirkung von Faktoren aufgehoben, die zu einem falschpositiven Ergebnis führen können.

iii) Testdurchführung

Die Messung der LPS-Gehalte wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Verdünnungsschritte von 10^{0-8} der zu untersuchenden Probe wurden im Verhältnis 1 : 1 mit jeweils 30 μ l des Lysats gemischt. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte eine Stunde bei 37 Grad unter völliger Erschütterungsfreiheit inkubiert. Nach einer weiteren Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde der Test ausgewertet, wobei Gelbildung als positives Resultat galt. Alle Übergänge von positiven zu negativen Ergebnissen wurden als partielle Reaktion gewertet. Der LPS-Gehalt wurde nach der Formel

$$\text{Titrationstufe} \times \text{Empfindlichkeit} = \text{EU/ml}$$

berechnet. Im Falle einer partiellen Reaktion wurde der Logarithmus der Titrationstufe halbiert.

Säulenchromatographie

Zur Ermittlung der Molekülgröße wurde die präparative Säulenchromatographie herangezogen. Es wurde Sepharose CL-2B verwendet (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden). Nach Aufschwemmung des Gels in Eluatpuffer (0,1 M NaCl, pH 7,2) wurde eine Säule (90 x 2,5 cm, Pharmacia Fine Chemicals, Schweden) beschickt, für 24 Stunden gespült und mit Blue Dextran 2000^r (10 mg/ml, Pharmacia Fine Chemicals, Schweden; MW ca. 2×10^6) kalibriert. Probenvolumina der einzelnen Lysate von 5 ml wurden nach Pelletierung (20000 g/min) mit der entsprechenden Menge Eluatpuffer suspendiert und auf die Säule aufgetragen. Die Eluierung erfolgte bei Zimmertemperatur unter einem Druck von 45-50 cm Wassersäule. Die Extinktion des Eluats wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen (LKB 2238 Uvicord S II) und von einem Schreiber registriert (LKB 2210 2-Channel Recorder). Fraktionen von 5 ml wurden aufgefangen (Fraktionssammler LKB 2070 Ultracac^r II). Die Peaks wurden gepoolt und durch Dialyse gegen Carbowax (Serva, Heidelberg) auf ihr Original-

volumen eingeengt. Von der halben Höhe des Peaks von Blue Dextran^r wurde ein Lot auf den linken Schenkel gefällt und somit das Leervolumen (V_0) ermittelt.

3.1.4. WIRKSAMKEITSPRÜFUNG

Infektionsbelastungsversuche

Tiere

Als Versuchstiere dienten weibliche NMRI-Mäuse mit einem Durchschnittsgewicht von 22-25 g bei Versuchsbeginn. Sie wurden in Makrolonkäfigen gehalten und mit Pellets (Sniff) und Leitungswasser versorgt. Eine Versuchsgruppe bestand aus 10 Tieren.

Pseudomonas aeruginosa-Modell

Die Mäuse wurden mit 0,2 ml der zu prüfenden Substanz intraperitoneal (i.p.) behandelt. 24 Stunden später erfolgte die i.p.-Belastung (0,1 ml) mit *Pseudomonas aeruginosa*-Keimen (institutseigene Stammsammlung), die bei Kontrolltieren zu einer Mortalität von 90 - 100 Prozent führten. Die Erreger wurden nach 18-stündiger Bebrütung auf Blutagarplatten mit 3 ml physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich auf vier Tage nach der Belastung.

Als Grundlage der LD_{50} -Berechnung nach Spearman-Kärber (Cavalli-Sforza, 1964) diente die Mortalitätsrate von Kontrolltieren, die mit differierenden Keimmengen der Bakteriensuspension in geometrischer Verdünnungsreihe belastet wurden. Der Challenge bestand aus der zweifachen LD_{50} . Die Keimzahl wurde mittels des Kochschen Oberflächenverfahrens ermittelt.

Auswertung

Als Kriterium der Wirksamkeit wurde die Reduktion der Mortalität der behandelten Tiere im Vergleich zu der Mortalität einer Kontrollgruppe herangezogen. Die Kontrolltiere erhielten physiologische NaCl-Lösung als Placebo, bzw. bei der Überprüfung von Enzymlysaten 1000 Einheiten Lysozym/ml einer Lysozym-NaCl-Lösung. Anhand der Formel

$$100 \times \frac{b - a}{b} = \text{Wirkungsindex (WI)}$$

a = % Mortalität der Lysat-behandelten Tiere

b = % Mortalität der Placebo-behandelten Tiere

wurde der Wirkungsindex berechnet. Ab Wirkungsindex 20 zeigte eine Substanz eine signifikante Mortalitätsreduzierung. Die Verdünnungsstufe eines Lysates, die noch einen WI von 20 erzielt, wird als eine Wirkungseinheit (WE) bezeichnet (Büttner und Mayr, 1986). Die Menge an Wirkungseinheiten wurde somit als Reziprokwert der höchsten Verdünnungsstufe eines Lysates ausgedrückt, bei der noch ein WI von 20 auftrat.

Nachweis der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität

Chromium 51 (^{51}Cr) -Freisetzungstest

In diesem Test wurden je 3 weibliche NMRI-Mäuse mit einem Gewicht von 18g - 22g i.p. mit den zu prüfenden bakteriellen Lysaten behandelt (0,2 ml). 24 Stunden später

wurden durch Auswaschen der Bauchhöhlen mit je 7 ml kaltem Phosphatpuffer unter Zusatz von 10 U/ml Heparin residente Peritonealzellen gewonnen. Diese wurden anschließend 2-mal mit Zellkulturmedium RPMI 1640 unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum gewaschen. Zellpopulationen mit einer Vitalität von über 95 % (ermittelt durch Trypanblau-Färbung) dienten als Effektorzellen (5×10^6 /ml). Zielzellen waren YAC-1 Lymphomzellen, die zuvor 1 Std. mit ^{51}Cr radiomarkiert wurden. Effektor-Zielzellenverhältnisse von 100 : 1, 50 : 1, 25 : 1 und 12,5 : 1 wurden 4 Std. bei 37 Grad inkubiert und anschließend mit einem Gamma-Counter (Searle Analytics) auf freigesetzte Radioaktivität untersucht (Counts pro Minute, cpm).

Auswertung

Das Bewertungskriterium war die spezifische Lysis von Zielzellen. Diese kann direkt aus der Höhe der freigesetzten Radioaktivität berechnet werden anhand der Formel:

$$\% \text{ spezifische Lysis} = \frac{\text{^{51}Cr-Freisetzung im Test}}{\text{maximale ^{51}Cr-Freisetzung} - \text{spontane ^{51}Cr-Freisetzung.}}$$

Die maximale Freisetzung wurde durch Zugabe eines Detergens (Triton^r 5 %ig) zu den markierten Zielzellen ermittelt.

3.2. ERGEBNISSE

3.2.1. EINFLUß DER LYSIERUNGSMETHODEN AUF DIE ZUSAMMENSETZUNG BAKTERIELLER LYSATE

Bestimmung des Proteingehaltes und der Extinktionswerte

Zunächst wurde die Frage untersucht, ob und wenn ja wieviel Bakterienprotein durch die verschiedenen Lysierungsmethoden freigesetzt wird. In Tabelle 4 ist der Proteingehalt vor und nach der Lysierung zusammengefaßt.

Zwischen den Lysaten der *E. coli*-Stämme waren keine Unterschiede festzustellen. Im Vergleich zur Ausgangssuspension erhöhten sich die Proteinwerte nur nach der alkalischen Hydrolyse und der Enzymlyse. Der Aufschluß der *E. coli*-Bakterien mit diesen beiden Methoden steigerte den Proteingehalt um das Zwei- bis Dreifache. Bei den *Bordetella bronchiseptica*-Keimen blieb die Hitzebehandlung ineffektiv. Die saure Hydrolyse erhöhte den Proteingehalt um Faktor 1,5, die alkalische Hydrolyse um Faktor 2,4 und die enzymatische Lyse um den Faktor 2,6. Das meiste Protein ließ sich aus den *Pasteurella*-Keimen mit der alkalischen Hydrolyse gewinnen. Gegenüber dem Ausgangswert hatte das Lysat den 4,5-fachen Proteingehalt.

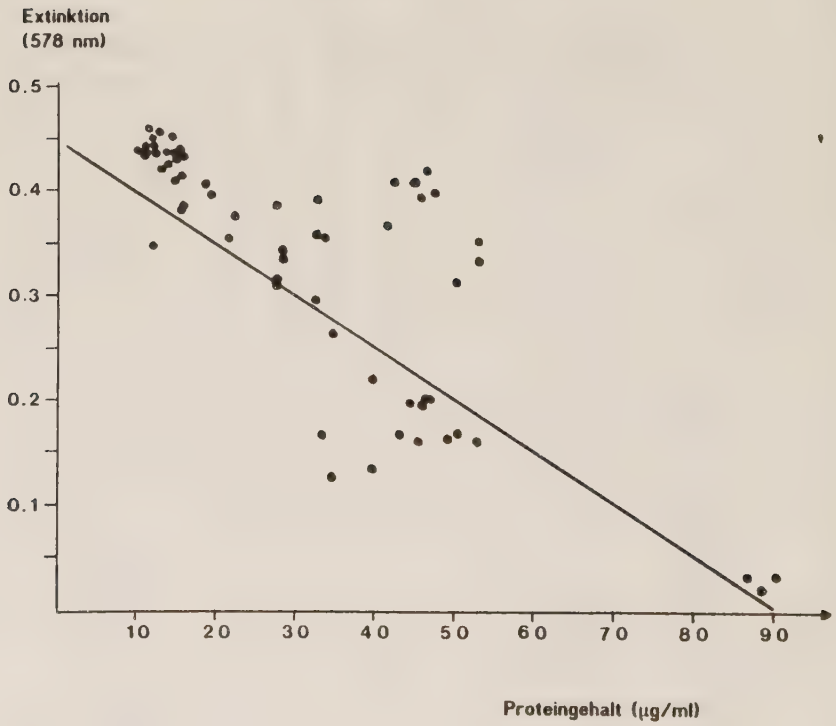
Die Standardfehler in Tabelle 4 geben gleichzeitig Aufschluß über die Reproduzierbarkeit der verschiedenen Lysierungsmethoden. Interessant ist hierbei nur die Abweichung bei der sauren, alkalischen und enzymatischen Lyse, da die Hitzelyse keinen Einfluß auf den Proteingehalt hatte. Die Schwankungsbreite der Endprodukte bewegte sich bei verschiedenen Ansätzen zwischen etwa 2 und 10 %. Die einzelnen Lysierungsmethoden sind also relativ gut zu reproduzieren.

Tab. 4: Proteingehalt ($\mu\text{g}/\text{ml}$) der bakteriellen Lysate und ihrer Ausgangssuspensionen
(Proteinwerte ermittelt nach Bradford, 1976)

Bakterienstamm	Proteingehalt Ausgangssus- pensionen	Proteingehalt der Lysate			
		Hitzelysat	Hydrolyse		enzymatische Lysierung
			sauer	alkalisch	
E.coli O101	14.5	13.650 ³ (0.244)	12.767 ⁷ (2.358)	35.860 ³ (5.541)	43.375 ³ (2.359)
E.coli O15	14.3	12.000 ⁶ (1.270)	13.535 ⁵ (1.765)	45.812 ⁴ (1.184)	45.908 ³ (1.892)
B.bronchiseptica	19.8	20.238 ⁴ (1.802)	30.375 ⁵ (2.488)	48.105 ⁵ (4.030)	51.917 ³ (1.010)
P.haemolytica	18.0	27.458 ³ (0.591)	35.330 ³ (3.736)	88.330 ³ (1.824)	n.g.

hochgestellte Ziffern: Probenumfang
Zahlen in Klammern: Standardfehler
n.g.: nicht getestet

Abb. 1: Beziehung zwischen Proteingehalt und Extinktionswert bei verschiedenen bakteriellen Lysaten (Korrelationskoeffizient: 0.802)



Die Extinktionswerte der Lysate stehen in einer direkten Beziehung zum Proteingehalt. Mit steigender Proteinmenge fällt die Extinktion (s. Abb. 1). Höchste Extinktionszahlen von durchschnittlich 0,439 (Hitzelysate von *E. coli* O15) stehen gegenüber einem gemitteltem Proteingehalt von 12,0 µg/ml. Im Gegensatz dazu weisen die o.g. Hydrolysate von *Pasteurella haemolytica* Extinktionswerte von 0,029 - 0,035 auf. Anhand des Proteingehaltes und der Extinktionswerte der verschiedenen Lysate lassen sich Rückschlüsse auf die verwendeten Bakterienstämme ziehen.

Bestimmung des Lipopolysaccharidgehaltes

Die Lipopolysaccharid (LPS) -Gehalte wurden mit dem Limulus-Test ermittelt. Die untere Nachweisgrenze lag bei einem LPS-Gehalt von 0,1 ng/ml. Diese Empfindlichkeit konnte durch Überprüfung mit einem Standardpräparat (*E. coli*-LPS) verifiziert werden. In Tabelle 5 sind die LPS-Gehalte der einzelnen Lysate im Vergleich zu den Ausgangssuspensionen aufgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, daß die verschiedenen Lysierungsmethoden kein zusätzliches LPS freisetzen. Mit Ausnahme der alkalischen Hydrolysate lagen die LPS-Gehalte der Lysate praktisch auf dem Niveau der Ausgangssuspensionen. Nach der alkalischen Hydrolyse verringerte sich der nachweisbare LPS-Gehalt um das Zehn- bis Einhundertfache im Vergleich zur Ausgangssuspension.

Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung

Die bakteriellen Lysate wurden durch säulenchromatographische Präparation auf ihre Molekülgröße hin untersucht. Der Fraktionierungsbereich war sehr breit gespannt und lag im Molekulargewichtsbereich von 7×10^4 - 4×10^7 . Alle

Tab. 5: Lipopolysaccharid (LPS) - Gehalt (ng/ml)¹⁾ der bakteriellen Lysate und ihrer Ausgangssuspensionen

Bakterienstamm	LPS-Gehalt der Ausgangssus- pensionen	LPS Gehalt der Lysate			
		Hitzelysat	Hydrolyse		enzymatische Lysierung
			sauer	alkalisch	
E.coli O101	$0.9 \times 10^{3.5}$	$0.9 \times 10^{3.5}$	$0.9 \times 10^{3.25}$	$1.0 \times 10^{1.5}$	$0.9 \times 10^{3.5}$
E.coli O15	$1.0 \times 10^{4.25}$	$1.0 \times 10^{4.25}$	$0.9 \times 10^{4.0}$	$1.0 \times 10^{2.75}$	$1.0 \times 10^{4.0}$
B.bronchiseptica	$1.0 \times 10^{3.75}$	$1.0 \times 10^{3.75}$	$1.0 \times 10^{3.75}$	$1.0 \times 10^{2.75}$	$1.0 \times 10^{3.75}$

1) Messung mit Limulus-Test

Lysate liefen im Ausschlußvolumen mit dem Molekülmarker Blue Dextran 2000^r. Dies bedeutet, daß die einzelnen Herstellungsverfahren nicht zu Spaltprodukten unterhalb einer Molekülgröße von 4×10^7 führen. Die Eluierung ergab immer nur einen Peak (Abb. 2).

Die obige Chromatographie wurde in einem Zeitraum von maximal drei Wochen nach der Herstellung der Lysate durchgeführt. Bei einer zweiten chromatographischen Untersuchung 8 Wochen nach Herstellung der Lysate veränderte sich das Chromatogramm. Bei den über drei Wochen bei +4 °C gelagerten Lysaten waren im Chromatogramm 2 bis 3 Peaks zu erkennen. Die Ergebnisse waren jedoch nicht einheitlich. Es waren weder die Chromatogramme der einzelnen Bakterienstämme, noch die der unterschiedlichen Lysierungsarten vergleichbar.

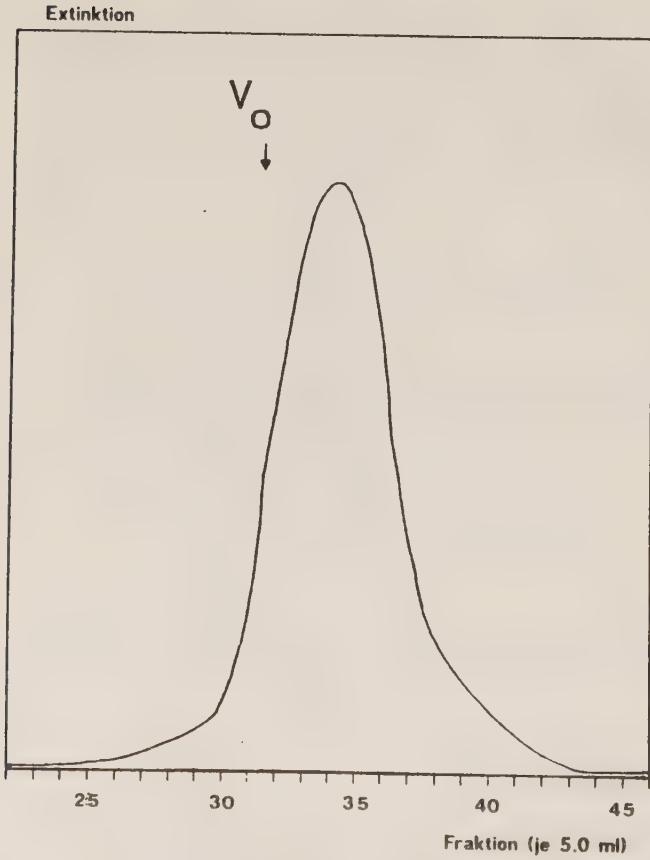
In einer zweiten Versuchsreihe wurde ein Langzeittest mit lyophilisierten Lysaten unternommen. In Abständen von jeweils zwei Wochen wurden die Lysate mit dem Eluierungspuffer (0,1 M NaCl, pH 7,2) resuspendiert und analysiert. Die Peaks der lyophilisierten Lysate blieben auch nach mehrmonatiger Lagerung einheitlich.

3.2.2. PARAMUNISIERENDE WIRKUNG VERSCHIEDENER BAKTERIELLER LYSATE

Infektionsbelastungsversuche

Die paramunisierende Wirkung von verschiedenen Lysaten wurde im Infektionsmodell mit *Pseudomonas aeruginosa* geprüft. Die Wirkungseinheiten der Lysate von *E. coli* O101 sowie die LPS- und Proteingehalte sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Abb. 2: Chromatogramm eines E.coli O101 - Hitzelysates (Absorbance 0.05; 280 nm; Sepharose CL - 2B)



V_0 = Leervolumen

Tab. 6: Proteingehalt, LPS-Gehalt und Wirkungseinheiten der E.coli O101-Lysate im Pseudomonas Modell¹⁾

Lysierungsmethode	Proteingehalt ² ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	LPS-Gehalt ³ (ng/ml)	Wirkungseinheiten
Hitzelysat	13.650	$0.9 \times 10^{3.5}$	500
saure Hydrolyse	12.767	$0.9 \times 10^{3.25}$	500
alkalische Hydrolyse	35.860	$1.0 \times 10^{1.5}$	5000
enzymatische Lysierung	43.375	$0.9 \times 10^{3.5}$	2500

1) Behandlung i.p. mit 0.2 ml 24 Stunden vor dem Challenge

2) ermittelt nach Bradford, 1976

3) ermittelt mit dem Limulus-Test

Die niedrigsten Wirkungseinheiten (500) hatten das Hitzelysat und das saure Hydrolysat. Die beiden Lysate wiesen den niedrigsten Protein- und den höchsten LPS-Gehalt auf. Das Enzymlysat mit dem 4-fachen Proteingehalt erreichte 5-mal mehr Wirkungseinheiten. Mit dem alkalischen Hydrolysat, das einen relativ hohen Proteingehalt und den mit Abstand niedrigsten LPS-Gehalt aufwies, wurde das beste paramunisierende Ergebnis erzielt (5000 WE).

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse im Infektionsmodell mit verschiedenen Lysaten eines *B. bronchiseptica*-Stammes zusammengestellt. Die niedrigsten Wirkungseinheiten (500 WE) brachten die Keimlysierungen mit Hitze und saurer Hydrolyse. Beide Lysate hatten, entsprechend denen der *E. coli* O101-Keime, den höchsten LPS-Gehalt und den niedrigsten Proteingehalt. Mit 5000 Wirkungseinheiten hatte das alkalische Hydrolysat, das den geringsten LPS- und den höchsten Proteingehalt aufwies, die beste Wirkung. Im Unterschied zu den *E. coli* O101-Lysaten lag die Wirksamkeit des Enzymlymates von *B. bronchiseptica* nur auf dem Niveau des Hitzelysates bzw. sauren Lysates, obwohl der Proteingehalt genauso hoch lag wie beim alkalischen Hydrolysat. Das Enzymlysat wies aber einen deutlich höheren LPS-Wert auf.

Die Reinigung der bakteriellen Lysate über die Säulenchromatographie brachte einen einheitlichen Peak. Im Pseudomonas-Modell wurde untersucht, ob der Peak die paramunisierenden Komponenten der Lysate enthält. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse bei einem sauren und alkalischen Hydrolysat von *E. coli* O101 und bei einem sauren Hydrolysat von *E. coli* O15 gezeigt. Die Proteinkonzentration der Peaks wurde denen der Ausgangslysate angeglichen, so daß die Wirkungsindices einen direkten Vergleich erlauben. Zwischen den Wirkungsindices von Peaks und von unbehandelten Lysaten waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen, d.h. die über die Säulenchromatographie aus Lysaten gewonnenen Peaks sind Träger paramunisierender Komponenten bei bakteriellen Lysaten.

Tab. 7: Proteingehalt, LPS-Gehalt und Wirkungseinheiten der B.bronchiseptica-Lysate im Pseudomonas Modell¹⁾

Lysierungsmethode	Proteingehalt ² ($\mu\text{g/ml}$)	LPS-Gehalt ³ (ng/ml)	Wirkungseinheiten
Hitzelysat	20.238	$1.0 \times 10^{3.75}$	500
saure Hydrolyse	30.375	$0.9 \times 10^{3.75}$	500
alkalische Hydrolyse	48.105	$1.0 \times 10^{2.75}$	5000
enzymatische Lysierung	51.917	$1.0 \times 10^{3.75}$	500

1) Behandlung i.p. mit 0.2 ml 24 Stunden vor dem Challenge

2) ermittelt nach Bradford, 1976

3) ermittelt mit dem Limulus-Test

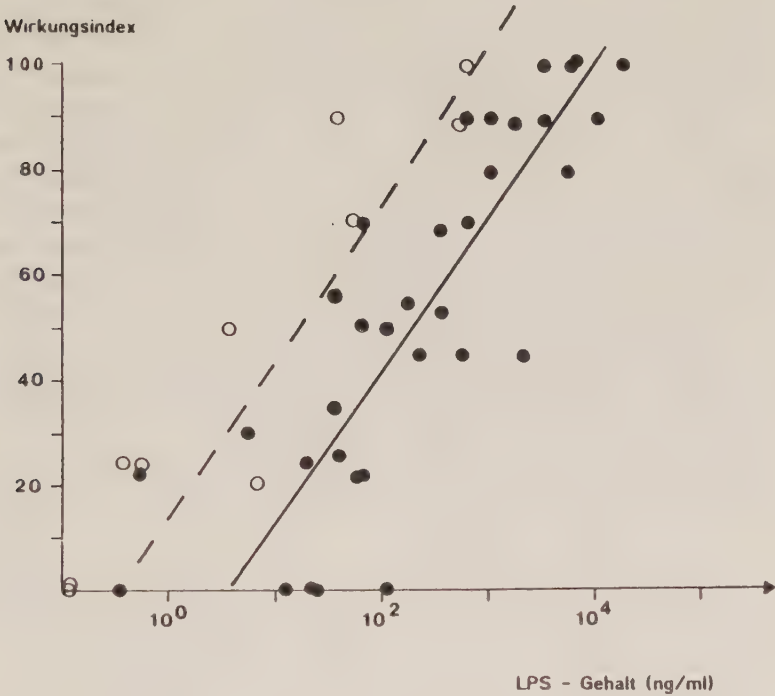
Tab. 8: Vergleich der Wirkungsindices im Pseudomonas-Modell¹⁾ zwischen einigen bakteriellen Lysaten und deren über Säulenchromatographie²⁾ eluierten Peaks

Bakterienstamm	Lysierungsmethode	Wirkungsindices der Gesamtlysate	der Peaks
E.coli O101	saure Hydrolyse	89	78
	alkalische Hydrolyse	80	75
E.coli O15 *	saure Hydrolyse	90	100

1) Behandlung i.p. mit 0.2 ml 24 Stunden vor dem Challenge

2) Sepharose CL-2B

Abb. 3: Lineare Regression des LPS - Gehaltes der bakteriellen Lysate, berechnet aus den Wirkungsindices im Pseudomonas - Modell bei i.p. Applikation



○ alkalische Hydrolysate

● saure Hydrolysate, Enzym- und Hitzelysate

-- Regressionsgerade der alkalischen Hydrolysate
(Korrelationskoeffizient: 0.895)

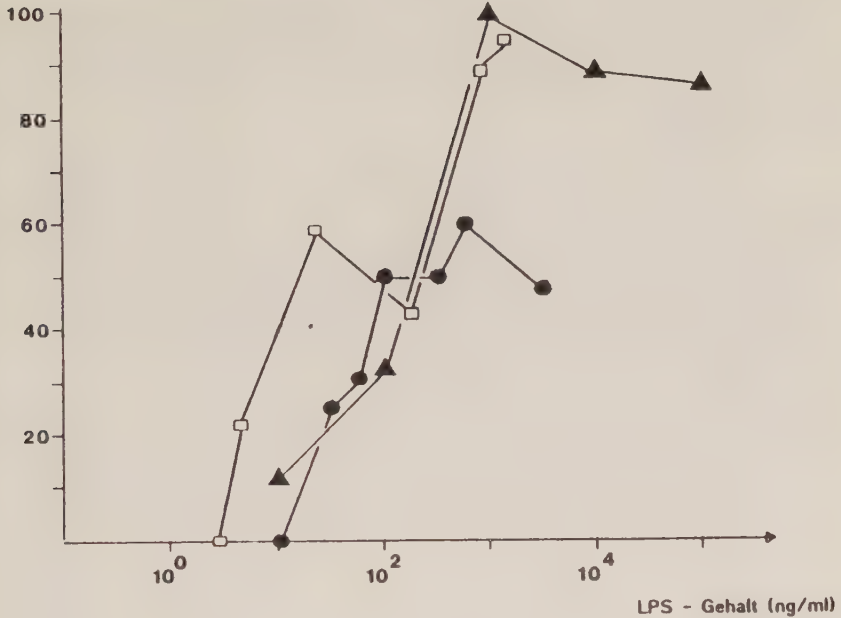
— Regressionsgerade der sauren Hydrolysate, Enzym- und Hitzelysate
(Korrelationskoeffizient: 0.869)

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Bedeutung des LPS für die paramunisierende Wirkung von bakteriellen Lysaten im *Pseudomonas*-Modell untersucht. In Abb. 3 sind die Wirkungsindices der verschiedenen Lysate in Abhängigkeit zu ihrem LPS-Gehalt eingetragen. Aus den Indices wurden zwei Regressionsgeraden errechnet; einerseits für die alkalischen Hydrolysate, zum anderen für die Hitze- und Enzymlysate sowie die sauren Hydrolysate. Beide Geraden zeigen, daß eine Abhängigkeit des Wirkungsindex zum LPS-Gehalt besteht. Mit zunehmendem LPS-Gehalt steigt die paramunisierende Wirkung der bakteriellen Lysate. Eine maximale LPS-Konzentration von $1 \times 10^{4 \cdot 25}$ ng/ml (Hitzelysat von *E. coli* O15) ruft einen Wirkungsindex von 100 hervor, die minimale Menge von $0,9 \times 10^{1 \cdot 25}$ ng/ml (saurer Hydrolysat von *E. coli* O101) bringt noch einen Wirkungsindex von 25. Bei den alkalischen Hydrolysaten reicht ein wesentlich niedrigerer LPS-Gehalt für deutlich höhere Wirkungsindices als bei den anderen Lysaten aus. Am stärksten ist dieser Unterschied bei den Lysaten von *E. coli* O101 und *B. bronchiseptica*.

Um die Bedeutung des LPS für die Wirksamkeit der Lysate weiter objektivieren zu können, wurde im *Pseudomonas*-Modell ein gereinigtes LPS-Präparat (LPS von *Salmonella typhosa*, DIFCO Laboratories) verglichen mit einem Westphal-Extrakt von *E. coli* O101 und dessen Ausgangslysat. Den Verlauf der Dosis-Wirkungskurven zeigt Abbildung 4. Die Wirkungsindices der drei unterschiedlichen Präparate stiegen zuerst relativ gleichmäßig mit steigendem LPS-Gehalt an. Ab einem LPS-Wert von 10^3 ng/ml fielen die Indices des Westphal-Extraktes ab. Interessanterweise erzielte das kommerzielle LPS-Präparat bei gleicher Dosierung einen höheren Index als der Westphal-Extrakt des bakteriellen Lysates. Beim Vergleich von Gesamtslysat und Westphal-Extrakt ist der unterschiedliche Kurvenverlauf im Bereich der hohen LPS-Werte überraschend. Bei LPS-Dosierungen oberhalb von $10^{2 \cdot 75}$ ng/ml war bei gleichem LPS-Gehalt das Gesamtslysat wesentlich besser als der Westphal-Extrakt desselben Lysates.

Abb 4: Dosis - Wirkungskurven verschiedener Präparate im *Pseudomonas* - Modell
(Vorbehandlung: 0.2 ml i.p., 24 Stunden vor dem Challenge)

Wirkungsindex



Neben dem Lipopolysaccharid sind Proteine ein wichtiger Bestandteil der bakteriellen Lysate. Es war deshalb wichtig, die Bedeutung der Proteine für die paramunisierende Wirkung der Lysate festzulegen. Das Problem bei diesen Untersuchungen lag darin, daß es nicht gelang eine LPS-freie Proteinfraction zu gewinnen. Es gelang lediglich eine Proteinanreicherung. Die Ergebnisse einer Proteinfraction im Vergleich zum Gesamtlysat im *Pseudomonas*-Modell sind in Tabelle 9 wiedergegeben.

In den unverdünnten Proteinfractionen waren 100 µg/ml Protein und ca. 10^3 ng/ml LPS enthalten, während das Ausgangslysat 43,375 µg/ml Protein und 10^3 ng/ml LPS aufwies. Zum Vergleich wurden die Indices des reinen LPS-Präparates aufgeführt. Die ermittelten Wirkungsindices beweisen, daß die Wirkung der Lysate im *Pseudomonas*-Modell mit dem LPS-Gehalt korreliert. Die Erhöhung des Proteingehaltes hatte keinen Einfluß auf die Wirkungsindices. Das Präparat mit 100 µg/ml Protein und 1×10^3 ng/ml LPS erzielte einen Index von 75, das reine LPS-Präparat mit 10^3 ng/ml LPS einen Index von 100. Dieses Ergebnis wurde in allen Verdünnungsstufen bestätigt.

Spontane zellvermittelte Zytotoxizität

Als zweites Nachweismodell zur Überprüfung der bakteriellen Lysate und deren Komponenten diente der Zytotoxizitätstest. Für die Untersuchungen wurden die *E. coli* O101-Lysate ausgewählt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt.

Die höchsten Lysisraten induzierte das mit Lysozym behandelte Lysat. Die Lysisraten lagen zwischen 33 % (Effektor-Zielzellenverhältnis 100 : 1) bis ca. 18 % (Effektor-Zielzellenverhältnis 12,5 : 1). Diese Reaktion war aber hauptsächlich auf das im Lysat enthaltene Lysozym zurückzuführen, wie die Lysozym-Kontrolle zeigt. Das Lysozympräpa-

Tab. 9: Wirkungsindices eines bakteriellen Lysates, seiner Proteinfraktion¹⁾ und einem reinen LPS-Präparat²⁾ im *Pseudomonas aeruginosa*-Modell

Substanz	Proteingehalt ³⁾ (µg/ml)	LPS-Gehalt ⁴⁾ (ng/ml)	Wirkungsindex
Gesamtlysat	43.375	$1.0 \times 10^{3.5}$	100
	4.338	$1.0 \times 10^{2.5}$	69
	0.434	$1.0 \times 10^{1.5}$	56
LPS-Präparat	0.0	$1.0 \times 10^{3.0}$	100
	0.0	$1.0 \times 10^{2.0}$	33
	0.0	$1.0 \times 10^{1.0}$	12
Protein-Rohfraktion	100.0	$1.0 \times 10^{3.0}$	75
	10.0	$1.0 \times 10^{2.0}$	25
	1.0	$1.0 \times 10^{1.0}$	0

1) Proteinanreicherung nach Bhaduri und Demchick (1983), modifiziert

2) LPS von *S.typhosa* (DIFCO Lab.)

3) ermittelt nach Bradford, 1976

4) ermittelt mit dem Limulus-Test

Tab. 10: Prozentzahlen der spezifischen Lysis von YAC-1 Zielzellen nach Stimulation von peritonealen Effektorzellen der Maus mit PIND ORF und E.coli O101 - Lysaten

Substanz	LPS-Gehalt ¹⁾ (ng/ml)	Proteingehalt ²⁾ (µg/ml)	spezifische Lysis (X) bei Effektor-Zielzellenverhältnissen von			
			100:1	50:1	25:1	12,5:1
Hitzelysat	$0.9 \times 10^{3.5}$	13.650	18.4	13.4	10.1	6.2
saures Hydrolysat	$0.9 \times 10^{3.25}$	12.767	13.1	10.3	8.5	7.1
alkalisches Hydrolysat	$1.0 \times 10^{1.5}$	35.860	17.0	13.3	9.7	5.3
enzymatisches Lysat	$0.9 \times 10^{3.5}$	43.375	33.1	26.4	21.3	18.4
PIND ORF	n.g.	n.g.	34.2	26.5	21.0	18.0
Lysozym-NaCl - Lösung	n.g.	n.g.	30.1	26.3	21.6	14.0

1) ermittelt mit dem Limulus-Test

2) ermittelt nach Bradford (1976)

n.g. = nicht getestet

rat erzielte Lysisraten zwischen 30 % und 14 %, je nach Effektor-Zielzellenverhältnis. Die Ergebnisse der übrigen Lysate lagen etwa auf einem gleichen Niveau. Die Lysisraten waren aber um die Hälfte niedriger als beim Lysozym-Präparat und dem viralen Paramunitätsinducer PIND ORF (Positiv-Kontrolle).

Interessanterweise erzielten das Hitzelysat, das saure und alkalische Hydrolysat in etwa identische Lysisraten, obwohl sie deutliche Unterschiede im LPS- und Proteingehalt aufwiesen. Um die Bedeutung des LPS in den bakteriellen Lysaten für die Stimulierung der Natural-Killer-Zellen zu objektivieren wurden aus den verschiedenen Lysaten Westphal-Extrakte gewonnen und im Zytotoxizitätstest untersucht. Überraschenderweise übertraf das Ergebnis der Endotoxin-Rohfraktionen deutlich das Ergebnis der Gesamtlysate (vgl. Tab. 11 und Abb. 5). Die einzelnen Lysisraten konnten aber nicht absolut mit den LPS-Gehalten der Fraktionen in Zusammenhang gebracht werden. Die Endotoxinfraktion des alkalischen Hydrolysates hatte bei niedrigstem LPS-Gehalt die höchsten Lysisraten. Die Werte lagen je nach Effektor-Zielzellenverhältnis zwischen 49,8 % und 33,9 %. Dieses Ergebnis übertraf die Wirkung des viralen Paramunitäts-inducers PIND ORF (vgl. Tab. 10). Die Endotoxin-Rohfraktionen der anderen Lysate hatten etwa 0,5- bis 1-mal soviel LPS. Sie erzielten bei einem Effektor-Zielzellenverhältnis von 100 : 1 aber maximal Lysisraten zwischen 31,5 % (Hitze-lysat) und ca. 21 % (saures Hydrolysat und Enzymlysat).

Die Wirkung der Endotoxinfraktion eines *E. coli* O101-Lysates wurde im Zytotoxizitätstest in verschiedenen Verdünnungen untersucht. Als Vergleichspräparat liefen ein kommerzielles LPS-Präparat und das Ausgangslysat mit. Wie die Abbildung 6 zeigt, war der Verlauf der Dosis-Wirkungskurven der drei Präparate in etwa gleich. Die Kurve des reinen LPS-Präparates deckte sich im wesentlichen mit den Kurven des Gesamtlysates und der Endotoxinfraktion des Lysates.

Tab. 11: Prozentzahlen der spezifischen Lysis von YAC-1 Zielzellen nach Stimulation von peritonealen Effektorzellen der Maus mit Endotoxin-Rohfraktionen¹⁾, gewonnen aus verschiedenen E.coli O101 - Lysaten

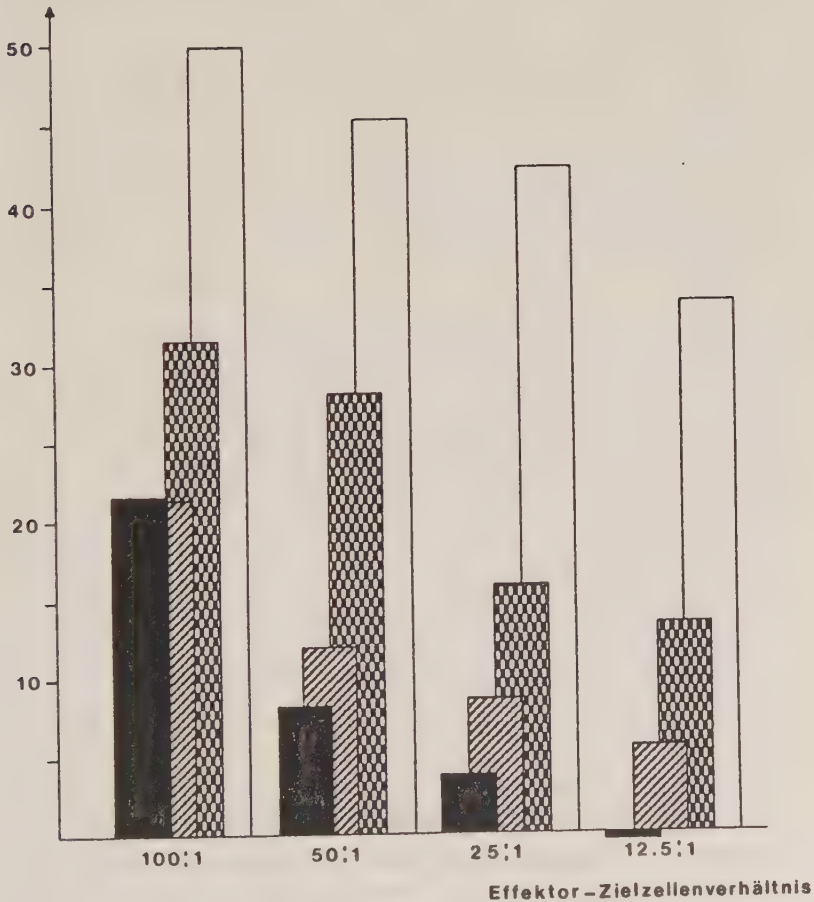
Endotoxin-Fraktion gewonnen aus:	LPS-Gehalt ²⁾ (ng/ml)	spezifische Lysis (%) bei Effektor-Zielzellenverhältnissen von			
		100:1	50:1	25:1	12,5:1
Hitzelysat	$1.0 \times 10^{3.5}$	31.5	28.0	15.8	13.3
saures Hydrolysat	$1.0 \times 10^{3.5}$	21.5	8.2	3.9	- 0.4
alkalisches Hydrolysat	$1.0 \times 10^{2.0}$	49.8	45.5	42.3	33.9
enzymatisches Lysat	$1.0 \times 10^{2.75}$	21.1	12.2	8.6	5.4

1) nach Westphal, Lüderitz und Bister (1952)

2) ermittelt mit dem Limulus-Test

Abb. 5: Vergleichende Darstellung der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität der von Endotoxinfraktionen der E.coli O101 - Lysate angeregten peritonealen Effektorzellen von Mäusen

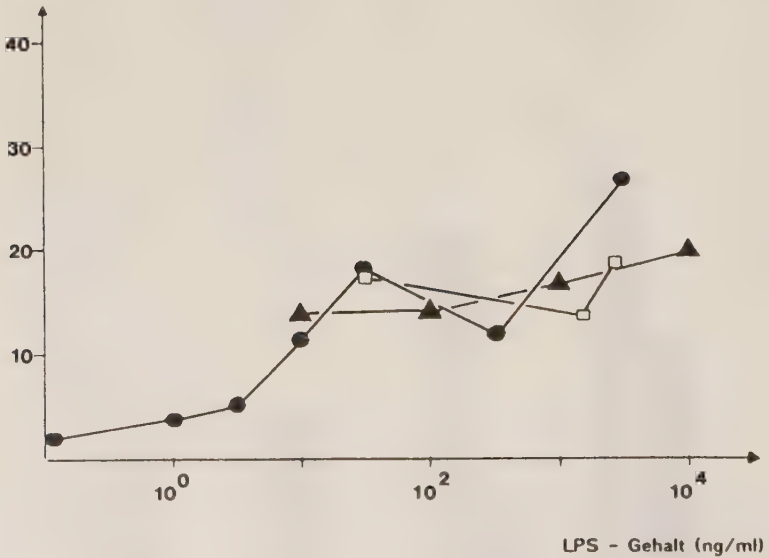
% spzf. Lysis
von YAC-1



- = Endotoxinfraktion des sauren Hydrolysates
- ▨ = Endotoxinfraktion des Enzymlysates
- ▩ = Endotoxinfraktion des Hitzelysates
- = Endotoxinfraktion des alkalischen Hydrolysates

Abb. 6: Dosis - Wirkungskurven verschiedener Präparate im Zytotoxizitätstest (Vorbehandlung: 0.2 ml i.p.) bei einem Effektor - Zielzellenverhältnis von 100:1

% spzf. Lysis
von YAC-1



▲ = LPS von *Salmonella typhosa* (DIFCO Lab.)

● = Endotoxinfraktion der *E. coli* O101 - Lysate

□ = *E. coli* O101 - Lysate

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten zunächst Parameter gefunden werden, die sich für die Standardisierung von bakteriellen Präparaten eignen, die zur Paramunisierung eingesetzt werden sollen. Bei den Präparaten handelte es sich um chemisch oder thermisch abgetötete Bakteriensuspensionen, die bereits in früheren experimentellen und klinischen Untersuchungen gute paramunisierende Eigenschaften aufwiesen (Adler, 1985; Borneff, 1986; Waldner, 1984; Schattenhofer, 1987). Die Prüfung der Lysate konzentrierte sich auf die beiden zentralen Bakterienbausteine "Protein" und "Lipopolysaccharid".

Der Proteingehalt der Lysate differierte zwar je nach Lysierungsmethode und Bakterienart bzw. Serotyp, jedoch nicht innerhalb verschiedener Chargen einer Methode. Dies zeigt, daß die hier eingesetzten Lysierungsmethoden gut reproduzierbar sind. Für die routinemäßige Herstellung ist die chemisch-analytische Bestimmung des Proteingehaltes relativ aufwendig. Deshalb wurde versucht eine einfache Alternative zu finden. Als Alternativmethode wurde die leicht und schnell durchzuführende Bestimmung der Extinktionswerte der Lysate gewählt. Die Korrelation der beiden Parameter war jedoch zu gering, als daß sie gegenseitig ersetzbar wären. Als Screening eignete sich jedoch die Ermittlung der Extinktionswerte.

Zur quantitativen Bestimmung des Lipopolysaccharids diente der Limulus-Test. Die Erfahrungen zeigen, daß die im Limulus-Test ermittelten LPS-Werte als Parameter zur Überprüfung der Herstellungsmethoden ebenso notwendig sind wie die Bestimmung der Proteine, denn die LPS-Konzentrationen der Lysate waren zum Teil sehr unterschiedlich. Die Unterschiede traten nicht innerhalb der Chargen sondern bei den verschiedenen Methoden auf. Die Lipopolysaccharidwerte der bakteriellen Lysate standen in keinem Zusammenhang zu den Protein- oder Extinktionswerten.

Überraschend waren die Ergebnisse der Molekülgrößenbestimmung bei den bakteriellen Lysaten. Die säulenchromatographischen Untersuchungen wiesen aus, daß nach der Lysierung keine Spaltprodukte unterhalb einer Molekülgröße von 4×10^7 auftreten. Da die Bakterien ca. $6 \times 1,5 \mu\text{m}$ groß sind, kann man davon ausgehen, daß sie durch die in dieser Arbeit geprüften Lysierungsmethoden nicht in einzelne Zellfragmente zerlegt wurden, sondern nur in ihrer Struktur und Zusammensetzung verändert wurden. Diese Ergebnisse legen dar, daß die gewählten chemischen, thermischen und enzymatischen Behandlungen der Bakterien nicht im eigentlichen Sinne zur Bildung von Lysaten führten. Spaltprodukte aufgrund autolytischer Prozesse konnten erst nach mehr als dreiwöchiger Lagerung bei $+4^\circ\text{C}$ nachgewiesen werden. Für die Lagerung der fertigen Präparate mußten deshalb Konservierungsmethoden gefunden werden. Als Möglichkeit zur Konservierung bewährte sich die Gefriertrocknung frisch hergestellter Lysate.

Obwohl die Lysate im Chromatogramm einheitlich waren, enthielten sie zum Teil sehr unterschiedliche Protein- und LPS-Gehalte. Das Ergebnis bei den beiden Komponenten unterschied sich aber deutlich. Im Falle des Lipopolysaccharids konnte weder die thermische und chemische noch die enzymatische Behandlung eine Erhöhung der Konzentration gegenüber den Ausgangssuspensionen erzielen. Durch die alkalische Behandlung wurde aber das Gegenteil erreicht, nämlich eine Reduzierung des LPS-Gehaltes bzw. eine Detoxifizierung des LPS. Damit bestätigten die Untersuchungen früher beschriebene Beobachtungen, wonach LPS durch eine alkalische Hydrolyse entgiftet werden kann (Skidmore et al., 1975; Weinberg, Chapman und Hibbs, 1978). Der Nachweis des LPS im Limulus-Test basiert auf einer Reaktion mit dem biologisch aktiven Lipidteil des LPS, dem Lipid A (Hitchcock et al., 1986). Durch eine basische Hydrolyse wird das Lipid A zerstört (Neter et al., 1960).

Der Proteingehalt der Lysate war dagegen sehr stark abhängig von der Behandlungsmethode. Deutliche Erhöhungen

des Proteingehaltes wurden durch die alkalische Hydrolyse und die Lysozymbehandlung erzielt. Im Gegensatz zum LPS-Gehalt hing die Proteinausbeute auch von der Wahl der Bakterienspezies und bei gleicher Spezies auch vom Serotyp ab. Man muß bei der Herstellung von bakteriellen Lysaten beachten, daß in der Proteinausbeute Unterschiede zwischen verschiedenen Stämmen einer Spezies auftreten können. Zur Standardisierung der Herstellung von Lysaten gehört auch die Verwendung von identischem Saatmaterial für die Produktion der Keimsuspension. In den vorliegenden Untersuchungen gab es deutliche Unterschiede zwischen einem E. coli O15- und E. coli O101-Stamm.

Die paramunisierende Wirkung der Lysate wurde im Hinblick auf die Bedeutung ihres Protein- und LPS-Gehaltes geprüft. Als Testsysteme wurden das bewährte *Pseudomonas*-Infektionsmodell (Adler, 1985; Campanile et al., 1986; Borneff, 1986) und der Zytotoxizitätstest (Brunner et al., 1968; Büttner und Mayr, 1986) verwendet. Dabei muß man berücksichtigen, daß in allen Präparaten die wirksamen Komponenten in einem identischen Molekülgrößenbereich liegen. Daraus folgt, daß die gleichen Zellbausteine unterschiedliche Wirkungen hervorriefen, je nachdem wie sie behandelt wurden. Dies bestätigte Erfahrungen aus früheren Untersuchungen. Den Teichonsäuren wurden je nach Präparation unterschiedliche Wirkungen zugesprochen (Hamada et al., 1985; Dziarski, Dziarski und Levinson, 1980; Chorpennig, 1985). Bei Tuberkulin wurde je nach Darstellungsweise einmal ein Produkt mit sensibilisierenden (Allergie vom Spättyp) und einmal ein Präparat ohne sensibilisierende Eigenschaften gewonnen (Morley et al., 1987). Die Wirkung des Bakterienlysates war demnach nicht nur an das Vorhandensein eines bestimmten Spaltproduktes, sondern auch an die Struktur dieses Fragmentes gebunden.

Mit Ausnahme des alkalischen Hydrolysates stand der LPS-Gehalt in einer Dosis-Wirkungsbeziehung zu den festgestellten paramunisierenden Wirkungen. Die optimale LPS-Konzentration für das rein dargestellte LPS lag im Pseudo-

monas-Modell bei ca. 10^3 ng/ml. Bei einer Erhöhung des LPS-Wertes fielen die Wirkungsindices. Bei diesen Dosen überwog die bekannte und beschriebene Toxizität (Siebert, 1923; Kadis, Weinbaum und Ajl, 1971; Mayr, Eissner und Mayr-Bibrack, 1984). Wie die durchgeführten Untersuchungen bewiesen, war das LPS der Bakterien aber nicht der alleinige Faktor für die paraspezifische Wirkung der bakteriellen Lysate. Es waren im Infektionsmodell häufig die Gesamtlysate wirksamer als kommerzielle LPS-Lösungen oder Westphal-Extrakte der Gesamtlysate. Vor allem bei den Dosis-Wirkungsbeziehungen traten in den höchsten Verdünnungsstufen Wirkungseffekte auf, die aufgrund der geringen LPS-Konzentrationen nicht auf einer LPS-spezifischen Wirkung beruhen. Dieses Ergebnis wurde noch durch die Wirkungen der alkalischen Hydrolysate bestätigt, die trotz der starken Detoxifizierung des LPS höchste Wirkungseinheiten im Pseudomonas-Modell erzielten. Das toxische Wirkungsprinzip des LPS war nicht unbedingt mit der immunmodulierenden Wirkung gekoppelt. Untersuchungen von Chedid et al. (1975) haben bewiesen, daß die immunstimulierende und die radioprotektive Wirkung auch nach Detoxifizierung des LPS erhalten bleiben, während die Eigenschaft zur Stimulierung der unspezifischen Abwehr gegenüber einer bakteriellen Infektion verlorenggeht. Chedid et al. verwendeten zur Entgiftung Succinyl-Anhydrid, während in den vorliegenden Untersuchungen die Entgiftung mittels alkalischer Hydrolyse vorgenommen wurde. Der Mechanismus der Detoxifizierung spielt demnach für den Erhalt der paraspezifischen Wirkung des Endotoxins eine wichtige Rolle.

Bei den Proteinfractionen konnte keine wirkliche Beziehung zur Wirksamkeit festgestellt werden. Es war aber sehr schwierig die paraspezifische Wirkung der Proteine exakt zu überprüfen, da es nicht gelang eine LPS-freie Proteinfraction zu isolieren. Bisher sind erst einige immunmodulatorisch relevante Proteinstrukturen reindargestellt worden (vgl. Schrifttum) und deren Wirkungen sind nur unvollständig

bekannt. Die LPS-Kontamination von biologischen Präparaten führt häufig zu falschen Rückschlüssen auf die wirksame Komponente. In einer Untersuchung über die passive Immunisierung gegen Meningokokken war der schützende Effekt tatsächlich auf eine Kontamination der Puffer und Kulturmedien mit LPS zurückzuführen (Woods et al., 1987).

Im Zytotoxizitätstest war im Gegensatz zu den Ergebnissen im Infektionsmodell eine absolute Korrelation zwischen den spezifischen Lysisraten und dem LPS-Gehalt der Bakterien festzustellen. Die Gesamtlysate waren in diesem Modell weniger wirksam als die Endotoxinfraktionen der Lysate. Die gute Wirkung des LPS im Zytotoxizitätstest war zu erwarten, da LPS bekannterweise die Aktivität der NK-Zellen über die Freisetzung von Interferon und Interleukin stimuliert (Lattime, 1986; Friedman et al., 1987). Auch im Zytotoxizitätstest war eine dosisabhängige Wirkung des LPS vorhanden. Der Grenzwert für eine stimulierende Wirkung des LPS im Zytotoxizitätstest lag bei ca. $10^{3,5}$ ng/ml. Dieser Wert war um ca. eine halbe Zehnerpotenz höher gelegen als im Infektionsmodell.

Die Ergebnisse beweisen, daß die objektive Einschätzung der immunmodulierenden Eigenschaften eines Bakterienlysates schwierig ist. Je nach Modell waren unterschiedliche Komponenten in unterschiedlichen Dosierungen als Wirkungsfaktor tätig. Grundsätzlich sind deshalb Präparate aus Einzelbestandteilen der Bakterien (z.B. LPS, MDP, SPA etc.) besser in ihrer Wirkung einzuschätzen. Dem steht die stärkere Wirkung der Gesamtlysate im Infektionsmodell gegenüber. Um eine optimale Wirksamkeit von Bakterienlysaten zu erreichen, wird eine Kombination definierter Bakterienbestandteile notwendig sein. Solange die Ergebnisse über die immunmodulierenden Wirkungen der verschiedenen Bakterienkomponenten unvollständig sind, kann die Herstellung von Paramunitäts-inducern nur im Hinblick auf bestimmte Modelle optimiert werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Keimsuspensionen unterschiedlicher Bakterienarten (*E. coli*, *B. bronchiseptica*, *P. haemolytica*) wurden mit Hitze, Säure, Lauge und Lysozym aufgeschlossen. Anschließend wurden die Keimlysate mittels Protein- und Lipopolysaccharidbestimmung, Extinktionsmessung sowie Säulenchromatographie mit dem Ziel charakterisiert, ein standardisiertes Präparat zur Immunstimulation herzustellen. Zur Bestimmung der immunmodulierenden Eigenschaften diente das *Pseudomonas*-Infektionsmodell und der Nachweis der zellvermittelten Zytotoxizität.

Die Behandlungen der Keimsuspensionen brachte unterschiedliche Präparate. Die alkalische Hydrolyse reduzierte die Toxizität des LPS und führte zu einer Erhöhung des Proteingehaltes. Die Hitzebehandlung und die saure Hydrolyse hatten kaum meßbare Veränderungen der Keimsuspensionen zur Folge. Die enzymatische Inkubation mit Lysozym steigerte den Proteingehalt. Neben den Behandlungsmethoden wurden die LPS- und Proteinwerte der Präparate auch durch die Keimart beeinflusst.

Die genannten Behandlungsverfahren lösten weniger eine Keimlysis als eine Strukturveränderung aus. Erst eine längere Lagerung bei 4°C (mehr als drei Wochen) führte zu einer Autolyse, die durch Gefriertrocknung der frischen Präparate verhindert werden konnte.

Im *Pseudomonas*-Infektionsmodell waren Gesamtlysate wirksamer als einzelne LPS- oder Proteinfractionen. Die paramunisierende Wirkung der Präparate basierte auf einem positiven Synergismus mehrerer Bakterienbestandteile.

Das Ergebnis im Zytotoxizitätstest korrelierte positiv mit dem LPS-Gehalt. Die beste Stimulierung erreichten Westphal-Extrakte von behandelten Keimsuspensionen.

SUMMARY

EXPERIMENTAL INVESTIGATIONS ABOUT THE STANDARDIZATION OF BACTERIAL PREPARATIONS FOR THE STIMULATION OF THE PARASPECIFIC DEFENSE

Bacterial suspensions of different bacterial strains (*E. coli*, *B. bronchiseptica*, *P. haemolytica*) were treated with heat, acid, alkaline and lysozyme. Then the bacterial lysates were characterized by protein and lipopolysaccharide determination, extinction measurement, and column chromatography to produce a standardized preparation for immunostimulation. The *Pseudomonas* infection model and the evidence of cell-mediated cytotoxicity were to determine the immunomodulating characteristics.

The treatment of the bacterial suspensions produced different preparations. The alkaline hydrolysis reduced the lps toxicity and led to an increase of the protein contents. The treatment with heat and the acid hydrolysis resulted in scarcely measurable changes of the suspensions. The enzymatic incubation with lysozyme increased the protein contents. Beside the kind of treatment the lps and protein values were influenced by the kind of bacteria, too.

The above mentioned treatment procedures caused less a lysis of bacteria than structural changings. An autolysis was not achieved before a long-storage (more than 3 weeks) at +4 °C, which could be prohibited by lyophilization of the fresh preparations.

In the *Pseudomonas* infection model, whole lysates were more efficient than single lps or protein fractions. The preparations paramunizing efficiency based on a positive synergism of different bacterial constituents.

The result in the cytotoxicity test correlated positively with the lps contents. Westphal extracts of treated bacterial suspensions led to the best stimulation.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aasjord, P., M. Nyland, R. Matre, 1986:
The Mitogenic Properties of Lipoteichoic Acid from *Staphylococcus aureus*.
Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. C 94, 91.
2. Abdulla, E.M., J.H. Schwab, 1966:
Biological Properties of Streptococcal Cell Wall Particles. III Dermonecrotic Reaction to Cell Wall Mucopeptides.
J. Bacteriol. 91, 374.
3. Adam, A., F. Ellouz, R. Ciorbaru, J.F. Petit, E. Lederer, 1975:
Peptidoglycan Adjuvants: Minimal Structure Required for Activity.
Z. Immun.-Forsch. 149, 341.
4. Adam, A., J.F. Petit, P. Lefrancier, P. Lederer, 1981:
Muramyl Peptides.
Molec. Cell. Biochem. 41, 359.
5. Adler, J., 1985:
Experimentelle Untersuchungen über die paramunisierenden Eigenschaften von Bakterienlysaten in bakteriellen Infektionsmodellen bei der Maus.
Vet. Med. Diss., München, 1985.
6. Andreev, N.N., N.A. Kudryashev, T.A. Stessel, 1930:
The Use of the Photoelectric Effect for the Determination of the Relations between Particle Number, Particle Dimensions, and the Magnitude of the Light Dispersion.
Kolloid.-Z. 52, 184.

7. Babu, U.M., A. Zeiger, 1983:
Soluble Peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*
Is a Murine B-Lymphocyte Mitogen.
Infect. Immun. 42, 1013.
8. Bahr, G.M., L.A. Chedid, K. Behbehani, 1987:
Induction, in vivo and in vitro, of the Macrophage
Membrane Interleukin-1 by Adjuvant-Active Synthetic
Muramyl Peptides.
Cell. Immunol. 107, 443.
9. Banck, G., A. Forsgren, 1978:
Many Bacterial Species Are Mitogenic for Human
Blood B-Lymphocytes.
Scand. J. Immunol. 8, 347.
10. Beachey, E.H., J.B. Dale, S. Grebe, A. Ahmed, W.A.
Simpson, I. Ofek, 1979:
Lymphocyte Binding and T Cell Mitogenic Properties
of Group A Streptococcal Lipoteichoic Acid.
J. Immunol. 122, 189.
11. Behling, U.H., 1983:
The Radioprotective Effect of Bacterial Endotoxin.
In: *Beneficial Effects of Endotoxins*. Ed.: A.
Nowotny, Plenum Press, New York, 1983; 127.
12. Bessler, W., U. Henning, 1979:
Protein I and Protein II from the Outer Membrane
of *Escherichia coli* Are Mouse B-Lymphocyte
Mitogenes.
Z. Immun.-Forsch. 155, 387.
13. Bessler, W., K. Resch, E. Hancock, K. Hantke, 1977:
Induction of Lymphocyte Proliferation and Membrane
Changes by Lipopeptide Derivatives of *Escherichia*
coli.
Z. Immun.-Forsch. 153, 11,

14. Bhaduri, S., P.H. Demchick, 1983:
Simple and rapid Method for Disruption of Bacteria
for Protein Studies.
Appl. Environ. Microbiol. 46, 941.
15. Bickel, H., K.H. Meyer, 1981:
Anwendung des L.A.L.-Tests im Rahmen der Inprozeß-
Kontrolle unter Berücksichtigung quantitativer
Aspekte.
Pharm. Ind. 43, 376.
16. Bolton, R.W., 1981:
Modulation of Murine Lymphocyte Mitogen Responses
by Glycerol-Teichoic Acid.
Immunol. Comm. 10, 631.
17. Borneff, C., 1986:
Vergleichende Untersuchungen über die paraspezi-
fische Stimulierung des Immunsystems (Paramuni-
sierung) mit Einfach- oder Kombinationspräparaten
aus bakteriellen Lysaten und Parapoxviren.
Vet. Med. Diss., München, 1986.
18. Bradford, M.M., 1976:
A rapid and sensitive Method for the Quantitation
of Microgram Quantities of Protein Utilizing the
Principle of Protein-Dye Binding.
Anal. Biochem. 72, 248.
19. Brunner, K.T., J. Mauel, J.C. Cerottini, B. Chapuis,
1968:
Quantitative Assay of the Lytic Action of Immune
Lymphoid Cells on ^{51}Cr -Labelled Allogenic Target
Cells in vitro.
J. Immunol. 14, 181.
20. Büttner, M., A. Mayr, 1986:
Tests on Protection against viral Diseases.
Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 9, 205.

21. Campanile, F., E. Bonmassar, M.C. Fioretti, C. Borghi, P. Pucetti, 1986:
Evaluation of Immunostimulant Activity in a Mouse Infection Model.
Int. J. Immunother. 2, 317.
22. Catalana, W.J., T.L. Ratliff, R.E. McCool, 1981:
Interferon Induced by *S. aureus* Protein A Augments Natural Killing and ADCC.
Nature 291, 77.
23. Cavalli-Sforza, L., 1964:
Grundbegriffe der Biometrie.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1964, 171.
24. Chedid, L., F. Audibert, C. Bona, C. Damais, F. Parant, M. Parant, 1975:
Biological Activities of Endotoxins Detoxified by Alkylation.
Infect. Immun. 12, 714.
25. Chedid, L., F. Audibert, 1984:
Bacterial Products with Immunomodulator Activity and new Vaccines.
EOS-J. Immunol. Immunopharm. 4, 74.
26. Chedid, L.A., M.A. Parant, F.M. Audibert, G.J. Riveau, F.J. Parant, E. Lederer, J.P. Choay, P.L. Lefrancier, 1982:
Biological Activity of a new Muramyl Peptide Adjuvant Devoid of Pyrogenicity.
Infect. Immun. 35, 417.
27. Chen, Y.U., R.E. Hancock, R.I. Mishell, 1980:
Mitogenic Effects of Purified Outer Membrane Proteins from *Pseudomonas aeruginosa*.
Infect. Immun. 28, 178.

28. Chorprenning, F.W., 1985:

The Impact of Teichoic Acids upon the Immunological System.

In: Immunology of the Bacterial Cell Envelope.

Eds.: D.E.S. Stewart-Tull, M. Davies, John Wiley and Sons, New York, 1985, 153.

29. Damais, C., C. Bona, L. Chedid, J. Fleck, C. Nauciel, J.P. Martin, 1975:

Mitogenic Effect of Bacterial Peptidoglycans Possessing Adjuvant Activity.

J. Immunol. 115, 268.

30. Dijkstra, J., J.W. Mellors, J.L. Ryan, F.C. Szoka, 1987:

Modulation of the Biological Activity of Bacterial Endotoxin by Incorporation in Liposomes.

J. Immunol. 138, 2663.

31. DiRienzo, J.M., K. Nakamura, M. Inouye, 1978:

The Outer Membrane Proteins of Gram-Negative Bacteria: Biosynthesis, Assembly, and Functions.

Ann. Rev. Biochem. 47, 481.

32. Dziarski, R., A. Dziarski, 1979:

Mitogenic Activity of Staphylococcal Peptidoglykan.

Infect. Immun. 23, 706.

33. Dziarski, R., A. Dziarski, I. Levinson, 1980:

Mitogenic Responsiveness of Mouse and Human Lymphocytes to Staphylococcus aureus Cell Wall, Teichoic Acid, and Peptidoglycan.

Int. Arch. Allergy Appl. Immun. 63, 383.

34. Enders, C., K. Kärnbach, 1937:

Measurement of Yeast Concentration with the Lange Colorimeter.

Wochschr. Brau. 54, 185.

35. Forsgren, A., A. Svedjelund, H. Wigzell, 1976:
Lymphocyte Stimulation by Protein A of *Staphylococcus aureus*.
Eur. J. Immunol. 6, 207.
36. Fox, A., R. Brown, S.K. Anderle, C. Chetty, W.J. Cromartie, H. Gooder, J.H. Schwab, 1982:
Arthropathic Properties Related to Molecular Weight of Peptidoglycan-Polysaccharide Polymers of Streptococcal Cell Wall.
Infect. Immun. 35, 1003.
37. Frank, G., 1932:
Über die Erforschung mitogenetischer Strahlung mittels einer neuen nephelometrischen Methode.
Biol. Z.-Blatt. 52, 1.
38. Freudenstein, H., H. Passing, 1981:
Standardization of BCG Vaccine by Bacterial Weight: Variables Influencing the Uniformity of the Product.
J. Biol. Standard. 9, 409.
39. Friedman, H., T. Klein, A. Szentivanyi, A. Nowotny, 1987:
Immunomodulation by Bacterial Products: Role of Intermediary Soluble Factors.
Int. J. Immunother. 3, 7.
40. Friedman, H., S. Specter, C. Butler, 1983:
Stimulation of Immunomodulatory Factors by Bacterial Endotoxins and Nontoxic Polysaccharides.
In: Beneficial Effects of Endotoxins. Ed.: A. Nowotny, Plenum Press, New York, 1983, 273.

41. Goldman, R.C., D. White, L. Leive, 1981:
Identification of Outer Membrane Proteins,
Including Known Lymphocyte Mitogens, as the Endo-
toxin Protein of *Escherichia coli* O111.
J. Immunol. 127, 1290.
42. Hadden, J.W., L. Delmonte, H.F. Oettgen, 1977:
Mechanism of Immunopotentialiation.
In: *Comprehensive Immunology 3, Immunopharma-
cology*. Eds.: R.A. Good, S.B. Day, Plenum Medical
Book Company, New York, 1977, 279.
43. Hamada, S., T. Yamamoto, T. Koga, J.R. McGhee, S.
Michalek, S. Yamamoto, 1985:
Chemical and Immunobiological Activities of Strep-
tococcal Lipoteichoic Acids.
Zbl. Bakt. Hyg. A 259, 228.
44. Helting, T.B., M. Kumpe, 1978:
A Sensitive Method for the Determination of the
Molecular Size of Meningococcal Polysaccharide
Vaccine.
J. Biol. Standard. 6, 111.
45. Heymer, B., E.T. Rietschel, 1977:
Biological Properties of Peptidoglycans.
In: *Microbiology*. Ed.: D. Schlessinger, Am. Soc.
Microbiol., Washington, 1977, 344.
46. Heymer, B., P.H. Seidl, K.H. Schleifer, 1985:
Immunochemistry and Biological Activity of
Peptidoglycan.
In: *Immunology of the Bacterial Cell Envelope*.
Eds.: D.E.S. Stewart-Tull, M. Davies, John Wiley
and Sons, New York, 1985, 11.

47. Hitchcock, P.J., L. Leive, H. Mäkelä, E.T. Rietschel, W. Strittmatter, D.C. Morrison, 1986:
Lipopolysaccharide Nomenclature - Past, Present and Future.
J. Bacteriol. 166, 699.
48. Hjelm, H., K. Hjelm, J. Sjöquist, 1972:
Protein A from *Staphylococcus aureus*. Its Isolation by Affinity Chromatography and its Use as an Immunosorbent for Isolation of Immunoglobulins.
FEBS Lett. 28, 73.
49. Hummel, D.S., A.J. Swift, A. Tomasz, J.A. Winkelstein, 1985:
Activation of the Alternative Complement Pathway by Pneumococcal Lipoteichoic Acid.
Infect. Immun. 47, 384.
50. Inouye, M., 1979:
What is the Outer Membrane?
In: Bacterial Outer Membranes. Ed.: M. Inouye, John Wiley and Sons, New York, 1979, 1.
51. Jacobs, D.M., D.C. Morrison, 1977:
Inhibition of the Mitogenic Response to Lipopolysaccharide (LPS) in Mouse Spleen Cells by Polymyxin B.
J. Immunol. 118, 21.
52. Janke, A., F. Sorgo, 1939:
Über die Wachstumsstoffe der Schimmelpilze.
Arch. Mikrobiol. 28, 1001.
53. Jolles, P., D. Migliore-Samour, R. Maral, F. Floch, 1975:
Low Molecular Weight Water-Soluble Peptidoglycans as Adjuvants and Immunostimulants.
Z. Immun.-Forsch. 149, 331.

54. Jones, C.M., D. Taramelli, C.A. Clouse, R.G. Goldfarb, 1984:
Role of Bacterial Lipopolysaccharide and Lymphokine in the Regulation of Macrophage Activation: Correlates between Secretion of Plasminogen Activator and Tumor Lysis.
Immunobiol. 166, 410.
55. Kadis, S., G. Weinbaum, S.J. Ajl, 1971:
Microbiological Toxins, Vol. V. Academic Press, New York, 1971.
56. Kendrick, P., G. Elderling, 1935:
Significans of Bacteriological Methods in the Diagnosis and Control of Whooping Cough.
Am. J. Publ. Health 25, 147.
57. Knox, K.W., A.J. Wicken, 1973:
Immunological Properties of Teichoic Acids.
Bacteriol. Rev. 37, 215.
58. Kotani, S., H. Takada, M. Tsujimoto, T. Ogawa, K. Kato, T. Okunaga, Y. Ishihara, A. Kawasaki, I. Morisaki, N. Kono, T. Shimono, T. Shiba, S. Kusumoto, M. Inage, K. Harada, T. Kitaura, S. Kano, S. Inai, K. Nagai, M. Matsumoto, T. Kubo, M. Kato, K. Yokogawa S. Kawata, A. Inoue, 1981:
Immunomodulating and Related Biological Activities of Bacterial Cell Walls and their Components, Enzymatically Prepared or Synthetized.
In: Immunomodulation by Bacteria and their Products. Eds.: H. Frieman, T.W. Klein, A. Szentivanyi, Plenum Press, New York, 1981, 231.

59. Kotani, S., H. Takada, M. Tsujimoto, T. Ogawa, Y. Mori, M. Sakuta, A. Kawasaki, M. Inage, S. Kusumoto, T. Shiba, N. Kasai, 1982:
Immunobiological Activities of Synthetic Lipid A Analogs and Related Compounds as Compared with those of Bacterial Lipopolysaccharide, Re-Glyco-lipid, Lipid A, and Muramyl Dipeptide.
Infect. Immun. 41, 758.
60. Kotani, S., Y. Watanabe, T. Shimono, T. Narita, K. Kato, D.E. Stewart-Tull, F. Kinoshita, K. Yokogawa, S. Kawata, T. Shiba, S. Kusumoto, Y. Tarumi, 1975:
Immunoadjuvant Activities of Cell Walls, Water-Soluble Fractions and Peptidoglycan Subunits, Prepared from Various Gram-Positive Bacteria, and from N-Acetylmuramyl Peptides.
Z. Immun.-Forsch. 149, 302.
61. Lattime, E.C., 1986:
Natural Cytotoxic Activity: an Introduction.
Immunol. Res. 5, 1.
62. LeClerc, C., L. Chedid, 1986:
Are there Receptors for MDP at the Macrophage Surface?
Int. J. Immunother. 2, 109.
63. Levinson, A.I., A. Dziarski, B. Zweiman, R. Dziarski, 1983:
Staphylococcal Peptidoglycan: T-Cell-Dependent Mitogen and Relatively T-Cell-Independent Polyclonal B-Cell Activator of Human Lymphocytes.
Infect. Immun. 39, 290.

64. Lüderitz, O., K. Tanamoto, C. Galanos, G.R. McKenzie, H. Brade, U. Zähringer, E.T. Rietschel, S. Kusumoto, T. Shiba, 1984:
Lipopolysaccharides: Structural Principles and Biologic Activities.
Rev. Infect. Dis. 6, 428.
65. Mayr, A., G. Eissner, B. Mayr-Bibrack, 1984:
Handbuch der Schutzimpfungen in der Tiermedizin.
Paul Parey Verlag, Berlin, 1984, 82.
66. McCauley, J.A., R.J. Mancinelli, G.W. Downing, J.B. Robbins, 1981:
Molecular Size Characterization of Bacterial Capsular Polysaccharide Vaccine with Sepharose CL-2B.
J. Biol. Standard. 9, 461.
67. Melchers, F., V. Braun, C. Galanos, 1975:
The Lipoprotein of the Outer Membrane of Escherichia coli: a B-Lymphocyte Mitogen.
J. Exp. Med. 142, 473.
68. Merle, P., L. Robbel, K.D. Hungerer, 1984:
A New Polyvalent Pseudomonas Vaccine.
Behring Inst. Mitt. 76, 113.
69. Milatz, J.M., P.B. Rottier, 1936:
A New Nephelometer and its Application in Microbiological Nephelometry.
Zbl. Bakt. II 94, 227.
70. Möller, G., G. Michael, 1971:
Frequency of Antigen-Sensitive Cells to Thymus-Independent Antigens.
Cell. Immunol. 2, 309.

71. Moore, R.N., P.S. Steeg, D.N. Männel, S.E. Mergenhagen, 1980:
Role of Lipopolysaccharide in Regulating Colony-Stimulating Factor-Dependent Macrophage Proliferation in vitro.
Infect. Immun. 30, 797.
72. Morley, S.M., J. Beck, J.M. Grange, R.A. Brown, T. Kardjito, 1987:
The Method of Preparation may Influence the Cellular Reaction to it in Skin Tests for Delayed Hypersensitivity: Comparison between Responses to two different Reagents Prepared from Mycobacterium tuberculosis.
Clin. Immunol. 69, 584.
73. Morrison, D.C., L.F. Kline, 1977:
Activation of the Classical and Properdin Pathways of Complement by Bacterial Lipopolysaccharide (LPS).
J. Immunol. 118, 362.
74. Munford, R.S., C.L. Hall, 1987:
Detoxification of Bacterial Lipopolysaccharides (Endotoxines) by an Human Neutrophil Enzyme.
Science 234, 203.
75. Nerkar, D.P., J.R. Bandekar, 1986:
Stimulation of Macrophages and Antitumor Activity of Radiodetoxified Endotoxin.
Microbiol. Immunol. 30, 893.
76. Neter, E., H. Anzai, A.A. Gorzynski, A. Nowotny, O. Westphal, 1960:
Effects of the Lipid A Component of Escherichia coli Endotoxin on Dermal Reactivity of Rabbits to Epinephrine.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 103, 783.

77. Nowotny, A., A. Abdelnoor, U.H. Behling, R.C. Butler, A.G. Johnson, A.M. Nowotny, 1982:
Molecular Aspects of the Adjuvant and Other Beneficial Effects of Endotoxins.
In: Immunomodulation by Bacterial Products and Related Synthetic Compounds. Eds.: Y. Yamamura, S. Kotani, I. Azuma, T. Shiba, Excerpta Medica, Amsterdam, 1982, 103.
78. Özel, M., K.N. Masihi, 1987:
Immunomodulating Interaction of Lipophilic Muramyl Dipeptide with Macrophages.
Int. J. Immunother. 3, 15.
79. Okamura, H., M. Wada, K. Nagata, T. Tamura, K. Shoji, 1987:
Induction of Murine Gamma Interferon Production by Lipopolysaccharide and Interleukin-2 in Propionibacterium acnes-Induced Peritoneal Exudate Cells.
Infect. Immun. 55, 335.
80. Pace, J.L., S.W. Russel, 1981:
Activation of Mouse Macrophages for Tumor Cell Killing.
J. Immunol. 126, 1836.
81. Parant, M., 1980:
Biologic Properties of a New Synthetic Adjuvant, Muramyl Dipeptide (MDP).
In: Immunostimulation. Eds.: L. Chedid, P.A. Miescher, J.J. Mueller-Eberhard, Springer-Verlag, 1980, 111.
82. Peavy, D.L., R.E. Baughn, D.M. Musher, 1978:
Mitogenic Activity of Bacterial Lipopolysaccharides in vivo: Morphological and Functional Characterization of the Responding Cells.
Infect. Immun. 19, 71.

83. Perkins, F.T., F.W. Sheffield, F.W. Outschorn, D.A. Hemsley, 1973:
An International Collaborative Study on the Measurement of the Opacity of Bacterial Suspensions.
J. Biol. Standard. 1, 1.
84. Phillips, N., L. Chedid, 1987:
Anti-Infectious Activity of Liposomal Muramyl Dipeptides in Immunodeficient CBA/N Mice.
Infect. Immun. 55, 1426.
85. Pittman, M., 1976:
History, Benefits and Limitations of Pyrex Glass Particle Opacity References.
J. Biol. Standard. 4, 115.
86. Pittman, M., R.M. Vargas, E.M. Perez, J.R. Merino, 1974:
Determination of the Bacterial Content of Cholera Vaccine.
J. Biol. Standard. 2, 1.
87. Räsänen, L., H. Arvilommi, 1981:
Cell Walls, Peptidoglycans, and Teichoic Acids of Grampositive Bacteria as Polyclonal Inducers and Immunomodulators of Proliferative and Lymphokine Responses of Human B and T Lymphocytes.
Infect. Immun. 34, 712.
88. Räsänen, L., E. Karhumäki, H. Arvilommi, 1978:
Bacteria Induce Lymphokine Synthesis Polyclonally in Human B Lymphocytes.
J. Immunol. 121, 418.
89. Räsänen, L., E. Karhumäki, R. Majuri, H. Arvilommi, 1980:
Polyclonal Activation of Human Lymphocytes by Bacteria.
Infect. Immun. 28, 368.

90. Räsänen, L., U.P. Mustikkamäki, H. Arvilommi, 1982:
 Polyclonal Response of Human Lymphocytes to
 Bacterial Cell Walls, Peptidoglycans and Teichoic
 Acids.
 Immunol. 45, 63.

91. Ratliff, T.L., R.E. McCool, W.J. Catalona, 1981:
 Interferon Induction and Augmentation of Natural
 Killer Activity by Staphylococcus Protein A.
 Cell. Immunol. 57, 1.

92. Ray, P.K., S.K. Bandyopadhyay, 1983:
 Inhibition of Rat Mammary Tumor Growth by Purified
 Protein A - a Potential Anti-Tumor Agent.
 Immunol. Comm. 12, 453.

93. Richards, O.W., T.L. Jahn, 1933:
 A Photoelectric Nephelometer for Estimating the
 Population Density of Microorganisms.
 J. Bacteriol. 26, 385.

94. Rolle, M., A. Mayr, 1984: Medizinische Mikrobiologie,
 Infektions- und Seuchenlehre. Enke Verlag,
 Stuttgart, 1984, 657.

95. Sager, S., G. Virella, W.Y. Chen, H.H., Fudenberg, 1984:
 Isolation and Characterization of an Outer
 Membrane Protein of Salmonella paratyphi B: a
 Mitogen and Polyclonal Activator of Human B
 Lymphocytes.
 Immunol. 52, 67.

96. Schattenhofer, O., 1987:
 Einfluß einer oralen Paramunisierung mit Bakte-
 rienlysaten und PIND ORF auf die Morbidität und
 Gewichtsentwicklung bei Absatzferkeln und Mast-
 schweinen.
 Vet. Med. Diss., München, 1987.

97. Seltmann, G., 1982: Die bakterielle Zellwand. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1982.
98. Siebert, F.B., 1923:
Fever Producing Substance in some Distilled Waters.
Am. J. Physiol. 67, 90.
99. Skidmore, B.J., J.M. Chiller, D.C. Morrison, W.O. Weigle, 1975:
Immunologic Properties of Bacterial Lipopolysaccharid (LPS): Correlation between the Mitogenic, Adjuvant, and Immunogenic Activities.
J. Immunol. 114, 770.
100. Smith, E.M., H.M. Johnson, J.E. Blalock, 1983:
Staphylococcus aureus Protein A Induces the Production of Interferon- α in Human Lymphocytes and Interferon- α/β in Mouse Spleen Cells.
J. Immunol. 130, 773.
101. Strauß, W., 1930:
Objektive Nephelometrie mittels des Mollschen Trübungsmessers, demonstriert am Beispiel der Bakterienzählung.
Zbl. Bakt. I Orig. 115, 228.
102. Vacheron, F., M. Guenounou, Ch. Nauciel, 1983:
Induction of Interleukin-1 Secretion by Adjuvant-Active Peptidoglycans.
Infect. Immun. 42, 1049
103. Vordermeier, H.M., H. Drexler, W.G. Bessler, 1987:
Polyclonal Activation of Human Peripheral Lymphocytes by Bacterial Porins and Defined Porin Fragments.
Immunol. Lett. 15, 121.

104. Vordermeier, M., K. Stüb, W.G. Bessler, 1986:
A Defined Fragment of Bacterial Protein I (OmpF)
Is a Polyclonal B-Cell Activator.
Infect. Immun. 51, 233.
105. Wachsmuth, E.D., 1979:
Local Cellular Reactions Following Intracutaneous
Injections of Various Adjuvants in Rats and Guinea
Pigs.
In: Function and Structure of the Immune System.
Eds.: W. Müller-Ruchholz, H.K. Müller-Hermelink,
Plenum Press, New York, 1979, 451.
106. Waldner, D., 1984:
Prophylaxe mittels Paramunisierung und Immunisie-
rung in Kälbermastbeständen unter Praxis-
bedingungen.
Vet. Med. Diss., München, 1984.
107. Weinberg, J.B., H.A. Chapman, J.B. Hibbs, 1978:
Characterization of the Effects of Endotoxin on
Macrophage Tumor Cell Killing.
J. Immunol. 121, 72.
108. Weinberg, J.B., E. Ribi, R.W. Wheat, 1983:
Enhancement of Macrophage-Mediated Tumor Cell
Killing by Outer Membrane Proteins (Porins).
Infect. Immun. 42, 219.
109. Wentworth, P.A., H.K. Ziegler, 1987:
The Antigenic and Mitogenic Response of Murine T
and B Lymphocytes to Soluble Proteins of *Listeria*
monocytogenes.
J. Immunol. 138, 2671.
110. Westphal, O., O. Lüderitz, F. Bister, 1952:
Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/
Wasser.
Z. Naturforsch. 7b, 148.

111. Whigham, E.A., R. Kleinmann, 1983:
Bacteria-Immune System Interactions. IX Modulation of Human and Murine Cytotoxic Reactions by Crude Lipoteichoic Acid Extracted from *Staphylococcus aureus*.
J. Immunopharm. 5, 77.
112. Wilkinson, B.J., Y. Kim, P.K. Peterson, P.G. Quie, A.F. Michael, 1978:
Activation of Complement by Cell Surface Components of *Staphylococcus aureus*.
Infect. Immun. 20, 388.
113. Wohlfeil, T., 1933:
Zur Kritik einiger Methoden der Bakterienzählung.
Zbl. Bakt. I Orig. 94, 492.
114. Wong, K.H., O. Barrera, A. Sutton, J. May, D.H. Hochstein, J.D. Robbins, J.B. Robbins, P.D. Parkman, E.B. Seligman, 1977:
Standardization and Control of Meningococcal Vaccines, Group A and Group C Polysaccharides.
J. Biol. Standard. 5, 197.
115. Woods, J.P., J.R. Black, D.S. Barritt, T.D. Connell, J.G. Cannon, 1987:
Resistance to Meningococcemia apparently Conferred by Anti-H.8 Monoclonal Antibody Is due to Contaminating Endotoxin and not to specific Immuno-protection.
Infect. Immun. 55, 1927.
116. Yamamoto, A., H. Usami, M. Nagamuta, Y. Sugawara, S. Hamada, T. Yamamoto, K. Kato, S. Kokeguchi, S. Kotani, 1985:
The Use of Lipoteichoic Acid (LTA) from *Staphylococcus pyogenes* to Induce a Serum Factor Causing Tumour Necrosis.
Br. J. Cancer 51, 739.

7. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr danke ich für die großzügige Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Ganz herzlichen Dank schulde ich Herrn Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer für seine fortwährende hilfsbereite Unterstützung und Betreuung.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der Universität München danke ich für Ihr Entgegenkommen. Besonders hilfreich waren mir Frau S. Wagner und Frl. B. Friedrichs, Herr Dr. M. Büttner und Herr Dr. G. Wolf, die maßgeblichen Anteil an der rechtzeitigen Fertigstellung der vorliegenden Arbeit haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Regierungsdirektor Dr. J. v. Stuckrad und seiner Mitarbeiterin Frl. U. Mucha, die mir stets ihre Hilfe angeboten haben.

8. LEBENSLAUF

- 08.02.1961 geboren als zweiter Sohn von Gertrud Wieler, geb. Weber, und Dr. med. vet. Walter Wieler in Bonn.
- 1967 - 1971 besuchte ich die katholische Volksschule in Königswinter-Oberpleis.
- August 1971 - Besuch des Städtischen Gymnasiums am
Mai 1980 Oelberg in Königswinter-Oberpleis.
- 23.05.1980 Abitur am Städtischen Gymnasium.
- Wintersemester 1980/81 Einschreibung an der Freien Universität Berlin im Studienfach Veterinärmedizin.
- 27.09.1982 Physikum
- Wintersemester 1982/83 Wechsel des Studienortes an die Ludwigs-Maximilians-Universität München.
- 28.11.1985 Staatsexamen gemäß der Approbationsordnung für Tierärzte mit Erfolg abgelegt.
- 24.02.1986 Bestallung.
- 01.04.1986 - Ableistung der Allgemeinen Wehrpflicht
30.06.1987 am Institut für Mikrobiologie an der Akademie des Sanitäts- und Gesundheitswesens der Bundeswehr und Beginn der vorliegenden Dissertation.
- 01.08.1987 - Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Medizinische
31.10.1987 Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der Universität München.
- seit 01.11.1987 wissenschaftlicher Assistent am Universitätsklinikum Ulm.

